

**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

Zentrale Cis- und Transregulation der pflanzlichen Hypoxieantwort

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

eingereicht an der
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

von

Philipp Gasch

geboren am 06.05.1987 in Leisnig

Bayreuth, April 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2011 bis April 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Frau Professor Dr. Angelika Mustroph angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 29.04.2015

Zulassung durch die Promotionskommission: 27.05.2015

Wissenschaftliches Kolloquium: 17.09.2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Angelika Mustroph	(Erstgutachterin)
Prof. Dr. Stephan Clemens	(Zweitgutachter)
PD. Dr. Ulrich Meve	(Vorsitz)
Prof. Dr. Dirk Schüler	

Teile dieser Arbeit wurden in dem Artikel

**„A Shoot-Specific Hypoxic Response of Arabidopsis Sheds
Light on the Role of the Phosphate-Responsive
Transcription Factor PHOSPHATE STARVATION
RESPONSE1”**

(Klecker et al., (2014) Plant Physiology 165: 774–790)

veröffentlicht.

Meinem Sohn Valentin

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
SUMMARY	1
ZUSAMMENFASSUNG	3
1. EINLEITUNG	5
1.1. Die Bedeutung von Sauerstoffmangel für Pflanzen während der Entwicklung und als Stressfaktor.....	5
1.2. Pflanzliche Reaktion auf Sauerstoffmangel.....	6
1.2.1. Morphologische und metabolische Antwort auf Hypoxiestress.....	6
1.2.2. Transkriptionelle Antwort auf Hypoxiestress und dessen Bedeutung	7
1.3. Group VII-ERF Transkriptionsfaktoren und Sauerstoffwahrnehmung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.3.1. Hypoxieinduzierte group VII-ERF Transkriptionsfaktoren HRE1 und HRE2.....	9
1.3.2. Konstitutiv transkribierte group VII-ERF Transkriptionsfaktoren RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12.....	11
1.3.3. Group VII-ERF Transkriptionsfaktoren als Substrate des <i>N-end rule pathways</i>	12
1.3.4. Redundanz und Hierarchie von group VII-ERF Transkriptionsfaktoren	15
1.4. Transkriptionelle Repression während und nach Sauerstoffmangel	16
1.5. Die cis-Regulation der Sauerstoffmangelantwort	17
1.5.1. Computerbasierte Vorhersagen	17
1.5.2. Die ATCTA Sequenz	18
1.5.3. Das <i>Anoxia Responsive Element</i> (ARE)	18
1.5.4. Alternative cis-Elemente bei der Hypoxieantwort.....	19
1.6. Zielsetzung	21
2. MATERIALIEN UND METHODEN	22
2.1. Organismen.....	22
2.1.1. Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen	22
2.1.2. Mikroorganismen	23
2.2. Molekularbiologische Standardmethoden.....	23
2.2.1. Wasser.....	23
2.2.2. Agarosegelelektrophorese.....	23
2.2.3. Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.2.4. Isolation von RNA aus Pflanzen	24
2.2.5. cDNA Synthese	24
2.2.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.6.1. Für Klonierung und Sequenzierung.....	25
2.2.6.2. Zur Insertion von Punktmutationen.....	25
2.2.6.3. Qualitativer und semiquantitativer Sequenznachweis und Kolonie-PCR.....	25
2.2.7. <i>Annealing</i> von einzelsträngigen Oligonukleotiden.....	26
2.2.8. DNA-Restriktionsverdau	26
2.2.8.1. Präparativer Restriktionsverdau	26
2.2.8.2. Analytischer Restriktionsverdau	26
2.2.9. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase	26

2.2.10.	DNA-Aufreinigung	26
2.2.11.	Ligation	27
2.2.12.	Gateway-Klonierung	27
2.2.13.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	28
2.2.13.1.	<i>E. coli</i>	28
2.2.13.2.	<i>A. tumefaciens</i>	28
2.2.14.	Transformation von Bakterien	28
2.2.14.1.	<i>E. coli</i>	28
2.2.14.2.	<i>A. tumefaciens</i>	29
2.2.15.	Mini- und Midi- Isolation von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	29
2.2.16.	Sequenzierung	29
2.2.17.	SDS PAGE, Westernblot und Immunodetektion	29
2.3.	Plasmide	30
2.3.1.	Binäre Plasmide zur stabilen Pflanzentransformation	30
2.3.2.	Plasmide zur transienten Protoplastentransformation	31
2.3.3.	Plasmide für das Hefe-1-Hybrid System	32
2.4.	Protoplastentransformation und Luziferasemessung	32
2.4.1.	Protoplastenisolation aus dem Blattmesophyll von <i>A. thaliana</i>	32
2.4.2.	Transiente Protoplastentransformation und Pharmakonbehandlung	33
	Für Experimente mit geringem Durchsatz	33
2.4.2.1.	Für Experimente mit hohem Durchsatz	33
2.4.3.	Quantitative Luziferasemessung	34
2.4.3.1.	Für Experimente mit geringem Durchsatz	34
2.4.3.2.	Für Experimente mit hohem Durchsatz	34
2.5.	Stabile Pflanzentransformation	35
2.6.	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Genotypen	35
2.7.	Hypoxiebehandlung und Überflutung	35
2.8.	Qualitative Biolumineszenzmessung <i>in vivo</i>	36
2.9.	Quantitative Realtime-PCR	36
2.10.	Messung der ADH-Aktivität	37
2.11.	Hefe-1-Hybrid System	37
2.11.1.	Transformation von Hefezellen	37
2.11.2.	Herstellung von stabilen Köderstämmen	38
2.11.3.	Protein-DNA Interaktionsnachweis	39
2.11.4.	β -Galactosidase Assay	39
2.12.	Phylogenetisches <i>shadowing</i>	40
2.13.	Vergleichendes phylogenetisches <i>Footprinting</i>	40
2.14.	Überrepräsentationsanalysen	41
3.	ERGEBNISSE	42
3.1.	Isolation von hypoxieresponsiven Promotoren	42
3.2.	Protoplastenbasiertes Screening nach Transregulatoren eines hypoxieresponsiven Promotors	45
3.3.	Untersuchungen zu potenziellen Repressoren hypoxieresponsiver Gene	49

3.3.1.	Constans-like Transkriptionsfaktoren als redundante Repressoren der transkriptionellen Hypoxieantwort.....	50
3.3.2.	RRTF1 besitzt keine essenzielle Funktion unter Hypoxie	53
3.3.3.	KANADI1 reprimiert einen funktionalen Promotorbereich von <i>LBD41</i>	56
3.3.4.	ZFP1 ist ein starker Repressor hypoxieresponsiver Promotoren.....	57
3.3.5.	LBD41 reprimiert Faktoren der Sauerstoffwahrnehmung.....	59
3.4.	Hinweise auf ökotypabhängige Existenz eines sechsten <i>group VII</i>-ERFs.....	61
3.5.	RAP2.2 und RAP2.12 sind redundante Hauptaktivatoren der Hypoxieantwort	65
3.6.	RAP2.2 ist ein spezifischer und direkter Aktivator hypoxieresponsiver Gene.....	72
3.7.	Phylogenetische und molekulare Zergliederung hypoxieresponsiver Promotoren	76
3.7.1.	Identifikation von RAP2.2- und hypoxieresponsiven Promotorregionen	77
3.7.2.	RAP2.2 und RAP2.12 binden an die 33bp-Region	82
3.7.3.	Musterabgleich und klassische Mustererkennung innerhalb der 33bp-Region	86
3.7.4.	Die 33bp-Region enthält ein evolutionär konserviertes Motiv	87
3.7.5.	Das konservierte C9-Motiv ist entscheidend für die RAP2.2 und RAP2.12 induzierte Promotoraktivierung	92
3.7.6.	Das C9-Motiv teilt sich Sequenzinformationen und Funktionen mit dem ARE, aber nicht mit dem ATCTA	96
4.	DISKUSSION.....	99
4.1.	Entdeckung und Validierung von negativen Transregulatoren der Hypoxieantwort.....	99
4.2.	Rolle von <i>group VII</i>-ERFs bei der Hypoxieantwort	102
4.2.1.	Redundanz und Hierarchie von <i>group VII</i> -ERFs unter Sauerstoffmangel	102
4.3.	Charakterisierung von hypoxieresponsiven Promotoren.....	107
4.3.1.	Promotoren sind Ziele der NERP-abhängigen Hypoxieantwort	107
4.3.2.	Deletionskartierung.....	109
4.3.3.	Eignung des <i>LBD41</i> Promotors zur Identifikation eines hypoxieresponsiven cis-regulatorischen Elements	109
4.3.4.	Rolle der ATCTA-Sequenz bei Hypoxie	110
4.3.5.	Computerbasierte Vorhersagen von hypoxieresponsiven cis-Elementen.....	111
4.3.6.	Das C9-Motiv ist ein authentisches cis-Element und Teil eines cis-regulatorischen Codes	114
4.3.7.	Abgrenzung zum ARE	116
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	120
6.	ANHANG	138

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
3AT	3 Amino-1,2,4 triazol
<i>A. lyrata</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABRE	Abscisic Acid Responsive Element
ACBP	Acyl-CoA-Binding Protein
ACS8	1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 8
AD	Aktivator-domäne
ADH	ALCOHOL DEHYDROGENASE
ALE	ARE-Like Element
amiRNA	artificial microRNA
ANOVA	analysis of variance
ANT	AINTEGUMENTA
AP2	APETALA 2
ARE	Anoxia Responsives Element
AS2	ASYMMETRIC LEAVES 2
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATE	arginyl-tRNA:protein Arginyltransferase
AtMYB2	<i>Arabidopsis thaliana</i> MYB DOMAIN PROTEIN 2
ATP	Adenosintriphosphat
attB	attachment site B
AUS	Upstream activation sequence
BBX	B-BOX DOMAIN PROTEIN
BD	Bindedomäne
BLAST	Basic Local Alignment Search
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
<i>C. rubella</i>	<i>Capsella rubella</i>
C9	Cluster9
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CCT	CO, COL, TOC1
cDNA	komplementäre DNA
CDS	kodierende Sequenz
CES-1	<i>Caenorhabditis elegans</i> Snail-type TF 1
CHX	Cycloheximid
CKC/ANT	COMPLEMENTING A PROTEIN KINASE MUTANT
CO	CONSTANS
COL	CO-like
Col-0	Columbia
CRE	cis-regulatorisches Element
Ct-1	Catania
C-terminal	Carboxy-Terminal

Ct-Wert	cycle threshold
Cvi-0	Cape Verde Islands
Cys	Cystein
d	Tag
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAseI	Desoxiribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRE	Dehydration-Responsive Element
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAR-Motiv	ERF-associated amphiphilic repression Motiv
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-1- α	Elongationsfaktor 1 alpha
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
EREBP	Ethylene-responsive element binding protein
ERF	Ethylene Responsive Factor
EtOH	Ethanol
fLUC	firefly-Luziferase
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GA	Gibberellinsäure
GCBP-1	GC-bindendes Protein-1
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GW	Gateway
H1H	Hefe-1-hybrid
HA	Hämagglutinin
HB1	Hämoglobin 1
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRA1	HYPOXIA RESPONSIVE ATTENUATOR 1
HRE	HYPOXIA RESPONSIVE ERF
HUP	hypoxia-responsive unknown protein
KAN1	KANADI 1
kb	kilobase
kDa	kilodalton
Km	Michaelis-Menten-Konstante
Kn-0	Kaunas
Kro-0	Krotzenburg
l	Liter
LBD41	LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41
LDH	L-Lactatdehydrogenase
Ler-0	Landsberg erecta
LOB	Lateral Organ Boundaries
LUC	Luziferase

M	Molar
m	Meter
MAP	METHIONIN AMINOPEPTIDASE
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Met	Methionin
MGD3	MONOGALACTOSYL DIACYLGLYCEROL SYNTHASE 3
min	Minute
MMg	Mannitol/Mg
mRNA	messenger-RNA
MS	Murashige und Skoog
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NERP	N-end-rule Pathway
NPTII	NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE II
N-terminal	Amino-terminal
OE	Überexpression
P1BS	PHR1 Binding Site
PCO	PLANT CYSTEIN OXIDASE
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	PYRUVAT DECARBOXYLASE
PDS	PHYTOENE DESATURASE
PEG	Polyethylenglycol
PHL1	PHR1-like 1
PHR1	PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1
PPi	Pyrophosphat
prom	Promotor
PRT	PROTEOLYSIS
PSSM	Position Specific Scoring Matrix
PSY	PHYTOENE SYNTHASE
PTA	Protoplastentransaktivierungsassay
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RAP2	RELATED TO APETALA 2
rLUC	Renilla Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per Minute
RRTF1	REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SAP18	SIN3 ASSOCIATED POLYPEPTIDE P18
Sc	Synthetic Complete
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
Sha	Shakdara

SK	SNORKEL
SLR1	SLENDER RICE 1
SLRL1	SLR1-like 1
Sp-0	Spandau
SRO5	SIMILAR TO RCD ONE 5
SUB1A	SUBMERGENCE 1 A
SUS	SUCROSE SYNTHASE
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestelle
TPL	TOPLESS
TPR	TPL-RELATED
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TSS	Transkriptionsstartseite
TUB	Tubulin
U	Unit
ÜN	über Nacht
Ura	Uracil
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
W5	Washing solution 5
WI	Washing/incubation solution
ZFP1	ZINC-FINGER PROTEIN 1

Summary

The sessile and aerobic nature of plants links their fitness to the surrounding oxygen availability. After heavy rainfalls, during waterlogging or submergence, intracellular oxygen concentration can drop below the K_m of the Cytochrome-c-Oxidase causing an ATP insufficiency. To counteract low internal oxygen (hypoxia), plants developed traits that improve gas supply or reduce oxygen consumption. The majority of such induced morphological and metabolic adaptations are caused by differential gene expression. In *Arabidopsis thaliana* the central hypoxia response is defined by the induction of 49 core genes, among them *ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* (*ADH1*), *PYRUVATE DECARBOXYLASE 1* (*PDC1*), *LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41* (*LBD41*), *HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR 1* (*HRA1*), *PLANT CYSTEINE OXIDASE 1* (*PCO1*) and *PCO2*. Approximately 50 % of these genes are positively regulated by group VII-ERF transcription factors encoded by at least five members in the *Arabidopsis thaliana* genome. *HYPOXIA RESPONSIVE ERF 1* (*HRE1*) and *HRE2* are activated under low oxygen whereas *RELATED TO AP2 2* (*RAP2.2*), *RAP2.3* and *RAP2.12* are constitutively transcribed. All members of the *Arabidopsis thaliana* group VII-ERFs are posttranslationally destabilized by a branch of the N-end-rule pathway (NERP), and accumulate in the nucleus upon hypoxia triggering their trans-activity. Redundancy of group VII-ERFs has been investigated in terms of low oxygen survival and differential gene regulation. However, quantitative impact of each member, as well as the redundancy causing mechanism and possible hierarchical relationships were not satisfactorily understood. Upon reaeration, the number of low oxygen marker gene transcripts decreases, which is regarded as important for survival under low oxygen conditions as their previous induction. *RAP2.12* shows nuclear presence during the decline of its target transcripts pointing to an active repression mechanism. However, the previously identified repressor of hypoxia responsive genes *HRA1* provides no sufficient explanation for post hypoxic repression.

This work started with the isolation of upstream sequences from hypoxia marker genes. The *LBD41*-Promoter which showed strong activity in NERP mutants and during hypoxic conditions was used to screen for trans-regulators of the hypoxic response. The activating function of group VII-ERFs was confirmed and the previously unknown positive impact of *RAP2.3* was discovered. Also potential repressors of the hypoxia responsive promoter were identified and further characterized. For REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 no regulatory function during the hypoxic response could be confirmed via transient overexpression and knock out mutant analyses. *KANADI1* and ZINC FINGER PROTEIN 1 likely possessed unspecific repressive capacities on group VII-ERF regulated promoters. Members of the Constans-like family revealed redundant repressor functions,

specific for hypoxia responsive promoters. Also LBD41 showed hypoxia specific repressor capacities which, unlike HRA1, did not depend on the presence of group VII-ERFs.

Resequencing of effector constructs uncovered the existence of a coding group VII-ERF gene that was similar but not identical to *RAP2.3*. Genotyping data implied that this gene was an allelic variation of *RAP2.3* which was present in a number of *Arabidopsis* accessions. Surprisingly, these ecotypes also contained a coding, intron less *RAP2.3* isoform which possibly displayed a functional processed pseudogene.

Functional redundancy of constitutively active group VII-ERFs was confirmed via measurement of ADH-activity in overexpression lines. Quantitative realtime PCR (qRT-PCR) analyses of *rap2.2/2.12* single and double knock out lines showed that both act equally redundant as main activators of hypoxia responsive genes. Residual expression of NERP target genes in absence of RAP2.2 and RAP2.12 pointed to a physiologically relevant involvement of RAP2.3. The measurement of double mutant susceptibility towards submergence conditions was impeded by contrasting survival rates of the different ecotypes used. RAP2.2 was further characterized as a hypoxia specific transcriptional activator. Using a system, allowing for inducible nuclear accumulation of a RAP2.2-fusion protein, direct target genes of RAP2.2 were identified.

Via deletion mapping of RAP2.2 target promoters, a 33bp long region was localized, that was activated through RAP2.2, RAP2.3 and RAP2.12 and under hypoxic conditions. Using a newly developed strategy that combines classical prediction approaches with phylogenetic analyses a conserved motif was found. In transactivation experiments of substitutional mutations and deletions this motif turned out to be essential in the 33bp long region and in two native hypoxia responsive promoters. The motif showed sequence similarity to the Anaerobic Responsive Element (ARE) which was mirrored, for example, by a shared direct interaction with group VII-ERFs in a yeast-1-hybrid assay. It was therefore named ARE-like element (ALE).

Zusammenfassung

Pflanzen sind obligat aerobe Organismen mit einer sessilen Lebensweise. Aus diesen Gründen ist die Fitness von Pflanzen von der lokalen Sauerstoffverfügbarkeit abhängig. Sinkt die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration (Hypoxie), zum Beispiel nach starken Regenfällen, während Staunässe oder Überflutung unter den K_m -Wert der Cytochrom-c-Oxidase, erfährt die Pflanze eine Energiekrise durch ATP-Mangel. Um dem entgegenzuwirken, haben Pflanzen Merkmale entwickelt, die die Verfügbarkeit von Sauerstoff entweder erhöhen, oder dessen Verbrauch herabsetzen. Dem größten Teil solcher induzierbaren morphologischen und metabolischen Remodellierungen liegt eine differenzielle Genregulation zugrunde. Die zentrale Hypoxieantwort von *Arabidopsis thaliana* wird durch eine systemische Induktion von 49 *core* Genen, darunter *ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* (*ADH1*), *PYRUVAT DECARBOXYLASE 1* (*PDC1*), *LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41* (*LBD41*), *HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR 1* (*HRA1*), *PLANT CYSTEINE OXIDASE 1* (*PCO1*) und *PCO2* definiert. Etwa 50 % dieser Gene sind Ziele von *group VII*-ERF Transkriptionsfaktoren, von welchen in *Arabidopsis thaliana* mindestens fünf Mitglieder vorkommen. *HYPOXIA RESPONSIVE ERF 1* (*HRE1*) und *HRE2* werden unter Hypoxiebedingungen transkriptionell aktiviert, während *RELATED TO AP2 2* (*RAP2.2*), *RAP2.3* und *RAP2.12* konstitutiv aktiviert vorliegen. Alle *group VII*-ERFs von *Arabidopsis thaliana* werden posttranslational durch einen Zweig des *N-end-rule Pathways* (NERP) sauerstoffabhängig destabilisiert, während Sauerstoffmangel deren Transaktivität über eine nukleare Akkumulation auslöst. Die Redundanz von *group VII*-ERFs wurde vorher auf den Ebenen der Hypoxieanfälligkeit und Genregulation untersucht. Dennoch sind der quantitative Einfluss jedes Mitglieds, der zugrundeliegende Mechanismus der Redundanz und mögliche Hierarchien unter *group VII*-ERFs nicht ausreichend verstanden. Bei Wiederbelüftung kommt es zu einer posthypoxischen Abnahme der mRNA von *group VII*-ERF Zielgenen, welche als ebenso überlebensnotwendig angesehen wird, wie deren anfängliche Hypoxieinduktion. Da *RAP2.12* länger im Nukleus residiert als die mRNA seiner Zielgene, wird von einem aktiven Repressionsmechanismus ausgegangen, welcher nicht allein durch das Wirken des Repressors *HRA1* erklärt werden kann.

Die Basis der vorliegenden Arbeit war die Isolation von Promotoren von Hypoxiemarkergenen. Der *LBD41*-Promotor, welcher in einer NERP-Mutante und unter Hypoxie aktiv war, wurde für ein Screening nach Transregulatoren der Hypoxieantwort genutzt. Dabei wurden zum einen *group VII*-ERFs als Aktivatoren der Hypoxieantwort bestätigt, und ein bis dahin noch unbekannter positiver Einfluss von *RAP2.3* auf die Hypoxieinduktion entdeckt. Zum anderen wurden potenzielle Repressoren identifiziert, welche im ersten Teil dieser Arbeit genauer untersucht wurden. Dem REDOX RESPONSIVE

TRANSCRIPTION FACTOR 1 konnte durch transiente Überexpression und *knock out* Analysen keine Funktion für die Regulation unter Sauerstoffmangel zugeschrieben werden. KANADI1 und ZINC FINGER PROTEIN 1 waren in der Lage, hypoxieresponsive Promotoren, wahrscheinlich jedoch unspezifisch, zu reprimieren. Mitglieder der Constans-like Familie enthüllten hingegen eine redundante Repressorfunktion, spezifisch für hypoxieresponsive Promotoren. LBD41 zeigte ebenso hypoxiespezifische Repressoreigenschaften, welche, im Gegensatz zu denen von HRA1, wahrscheinlich nicht auf einer Interaktion mit *group VII-ERFs* beruhten.

Die Resequenzierung von Effektorkonstrukten enthüllte die Existenz eines kodierenden *group VII-ERF* Gens, welches starke Ähnlichkeiten zu *RAP2.3* aufwies, jedoch nicht identisch mit diesem war. Genotypisierungsexperimente deuteten darauf hin, dass es sich bei diesem Gen um eine allelische Variante von *RAP2.3* handelte, welche in manchen Ökotypen auftauchte. Überraschenderweise enthielten diese Ökotypen zusätzlich eine kodierende, intronfreie *RAP2.3* Version, welche möglicherweise ein funktionales prozessiertes Pseudogen darstellte.

Die funktionelle Redundanz von konstitutiv aktiven *group VII-ERFs* wurde mittels ADH-Aktivitätsmessung in stabilen Überexpressionslinien bestätigt. Mittels quantitativer realtime PCR (qRT-PCR)- Analysen mit Einzel- und Doppelnulallelern von *RAP2.2* und *RAP2.12* wurden beide als gleichrangige Hauptaktivatoren der Hypoxieantwort charakterisiert. Eine minimale Restexpression von Hypoxiemarkergenen bei Abwesenheit von *RAP2.2* und *RAP2.12* ließ auf eine physiologisch relevante Beteiligung von *RAP2.3* schließen. Die Messung der Überflutungsanfälligkeit von *rap2.2/2.12* Mutanten wurde durch natürliche Schwankungen der Überlebensrate eingekreuzter Ökotypen erschwert. *RAP2.2* wurde im weiteren Verlauf als hypoxiespezifischer transkriptioneller Aktivator charakterisiert. Mittels induzierter nuklearer Akkumulation eines *RAP2.2*-Fusionsproteins konnten direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors identifiziert werden.

Mittels Deletionskartierung von Promotoren direkter *RAP2.2*-Zielgene wurde eine 33 bp lange, positiv regulatorische Sequenz isoliert, welche durch *RAP2.2*, *RAP2.3* und *RAP2.12*, sowie unter Hypoxie aktiviert wurde. Mithilfe einer neu etablierten Strategie, welche klassische und phylogenetische Motivvorhersagen kombinierte, wurde ein konserviertes Motiv identifiziert. Dieses war sowohl in der 33bp langen Sequenz, als auch in nativen Promotoren funktional, was durch Transaktivierungsexperimente mit punktmutierten und deletierten Sequenzen nachgewiesen wurde. Das Motiv wies Sequenzähnlichkeiten zum Anaerobic Responsive Element auf, was sich unter anderem durch eine gemeinsame, direkte Interaktion mit *group VII-ERFs* in einem Hefe-1-Hybridsystem, auf funktionaler Ebene widerspiegelte. Es wurde deshalb als ARE-like element (ALE) bezeichnet.

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung von Sauerstoffmangel für Pflanzen während der Entwicklung und als Stressfaktor

Wie bei allen obligat aeroben Organismen beruht das Leben von Pflanzen auf der Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff, welcher bei der oxidativen Phosphorylierung als terminaler Elektronenakzeptor fungiert. Sauerstoff wird außerdem als Substrat für essenzielle Prozesse, wie die Entsättigung von Fettsäuren, Hämbiosynthese und Phytohormonsynthese benötigt und ist bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) involviert (Geigenberger, 2003; van Dongen und Licausi, 2015). Im Gegensatz zu den meisten Tieren sind Pflanzen sessil, wodurch ihre Fitness der lokalen Sauerstoffverfügbarkeit unterliegt. Darüber hinaus besitzen sie kein aktives Gasverteilungssystem, sondern transportieren Sauerstoff passiv über Diffusion und Konvektion (Armstrong et al., 2006; Ho et al., 2011). Dadurch sind heterotrophe, dichte, voluminöse und metabolisch stark aktive Organe bereits bei einer normalen atmosphärischen Sauerstoffverfügbarkeit von 20,95 % [v/v] mit einer geringeren internen Sauerstoffkonzentration konfrontiert (Armstrong et al., 1994; Gibbs et al., 1998; Geigenberger et al., 2000; van Dongen et al., 2003; Borisjuk und Rolletschek, 2009; Zabalza et al., 2009; Colmer und Greenway, 2011; Ho et al., 2011). Dieser physiologisch bedingte Sauerstoffmangel wird von genregulatorischen und metabolischen Veränderungen begleitet (Chervin et al., 1999; Licausi et al., 2011a; Lee et al., 2012; Kelliher und Walbot, 2014). Sauerstoffmangel-induzierbare Enzyme können zudem die Reifung von Früchten beeinflussen (Manríquez et al., 2006; Lara et al., 2011; Min et al., 2012), und in Mais-Antheren bestimmt ein programmierter Sauerstoffgradient sogar über die männliche Keimzellidentität (Kelliher und Walbot, 2012; Kelliher und Walbot, 2014).

Äußere Umweltfaktoren, wie Staunässe (Überflutung der Wurzel, zum Beispiel nach exzessivem Niederschlag) oder vollständige Überflutung können den intrazellulären Sauerstoffgehalt weiter herabsetzen, da die Diffusionsrate von Gasen in Wasser etwa um den Faktor 10^4 im Vergleich zur Luft verringert ist (Armstrong, 1979). Exogen bedingter Sauerstoffmangel kann zudem durch die Aktivität aerober Bodenorganismen verstärkt werden. In Abhängigkeit der photosynthetischen Aktivität, der Sauerstoffdiffusion aus dem umgebenden Milieu und dem internen Sauerstoffverbrauch kann es zum vollständigen Verlust intrazellulären Sauerstoffs kommen, ein Zustand, der als Anoxie bezeichnet wird (Drew, 1997; Geigenberger, 2003). Hypoxie wird hingegen jener Zustand genannt, bei welchem molekularer Sauerstoff noch verfügbar ist, jedoch im Vergleich zum atmosphärischen Anteil begrenzt vorliegt. Starker Sauerstoffverlust kann die mitochondriale

Atmung behindern (Gupta et al., 2009; Zabalza et al., 2009) und führt zu einer Energiekrise durch ATP Mangel (Geigenberger, 2003).

1.2. Pflanzliche Reaktion auf Sauerstoffmangel

1.2.1. Morphologische und metabolische Antwort auf Hypoxiestress

Um Überflutungssituationen zu überstehen, bilden manche Pflanzen Aerenchyme, Lentizellen oder Atemwurzeln aus, welche den passiven Transport von Luftsauerstoff in überflutete Pflanzenbereiche erleichtern können. Angepasste Pflanzen wie *Rumex palustris* oder Reis zeigen konstitutive morphologische Adaptionen (Clark und Harris, 1981; Visser et al., 1996b; McDonald, 2002), während solche Strukturen in anfälligen Spezies wie Weizen und Mais durch Überflutung induziert werden (Konings, 1982; Thomson et al., 1990).

Insbesondere langanhaltende Staunässe bedarf der Ethylen-vermittelten Neubildung von Adventivwurzeln mit Aerenchymenten zum Gasaustausch (Jackson und Drew, 1984; Laan et al., 1989; Visser et al., 1996a; Steffens und Sauter, 2005), weil bestehende Wurzelsysteme aufgrund von Sauerstoffmangel und der Akkumulation von mikrobiellen Toxinen (Ponnamperuma, 1984; Laanbroek, 1990) beschädigt werden. Zudem induzieren angepasste Arten Barrieren aus Lignin und Suberin in der Wurzel, um den radialen Sauerstoffverlust an das hypoxische Milieu zu minimieren. Diese Barrieren fördern zudem den passiven longitudinalen Sauerstofftransport und verhindern den Eintritt von toxischen Ionen (Armstrong, 1979; Visser et al., 2000; Colmer, 2003; Garthwaite et al., 2003). Um bei Staunässe partielle Überflutung von oberirdischen Organen zu vermeiden, sind angepasste Rosettenpflanzen in der Lage, ihre Blätter durch eine hyponastische Aufwärtsbewegung ihrer Petiole vom Boden zu heben (Grimoldi et al., 1999; Cox et al., 2003).

Bei langanhaltender, vollständiger Überflutung in flachem Wasser führen manche Arten eine rapide Sprosselongation durch, um Gasaustausch und Photosynthese oberhalb der Wasseroberfläche zu gewährleisten. Diese *Escape*-Strategie wurde hauptsächlich bei Tiefwasserreis und *Rumex*-Spezies erforscht (Bailey-Serres und Voesenek, 2008). Sie bedarf genetischer Merkmale, die eine Neu-Orientierung der Wachstumsrichtung, beschleunigte Wachstumsraten von Petiolen und Sprossachsen, sowie Gasaustausch innerhalb der Pflanze und mit ihrer Umwelt erlauben (Colmer und Voesenek, 2009). Diese „Sauerstoffmangelflucht“-Strategie ist energetisch teuer (Setter und Laureles, 1996) und wird daher nicht bei zu hohen Wasserpegeln oder vorübergehender Überflutung favorisiert (Colmer und Voesenek, 2009).

Eine entgegengesetzte Strategie, welche vor allem bei kurz andauernder Überflutung stattfindet, inhibiert stattdessen das Wachstum bis zum Wiedereintritt von Sauerstoff. Sie wird

als *Quiescence*-Strategie bezeichnet und wurde vorallem an regenbewässertem Tieflandreis studiert (Bailey-Serres und Voesenek, 2008). Pflanzen, welche diese Strategie verfolgen, sind gekennzeichnet durch eine ökonomische ATP-Nutzung, die Induktion einer anaeroben ATP-Produktion und der Induktion von Schutzsystemen, welche einer Acetaldehyd-Toxizität und der Akkumulation von ROS bei Wiederbelüftung entgegenwirken (Colmer und Voesenek, 2009).

Die Anpassung des Metabolismus an Sauerstoffmangel ist vor allem bei kurzzeitigen Überflutungen nötig, weil die Bildung von Aerenchymen Zeit in Anspruch nimmt (Konings, 1982; Thomson et al., 1990). Aber auch Pflanzenstrukturen wie Wurzelspitzen, welche weit entfernt von einer durch *Escape* erreichten Sauerstoffquelle liegen, müssen wahrscheinlich eine metabolische Anoxietoleranz aufbauen (Colmer und Voesenek, 2009). Unter aeroben Bedingungen wird NADH in der Atmungskette zu NAD⁺, unter Bildung von ATP, reoxidiert. Unter stark hypoxischen Bedingungen (Geigenberger et al., 2000) kann Pyruvat reduktiv durch alkoholische Gärung mittels Pyruvatdehydrogenase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH) oder Milchsäuregärung mittels Laktatdehydrogenase (LDH) umgesetzt werden. Dabei wird zwar kein ATP gebildet, jedoch wird NAD⁺ regeneriert, was eine basale ATP-Bildung durch Substratkettenphosphorylierung bei der Glykolyse gewährleistet (Drew, 1997). Die begrenzte Verfügbarkeit von ATP unter Sauerstoffmangel (2-4 Moleküle ATP statt 30-36 Moleküle ATP pro Glukosemolekül unter aeroben Bedingungen (Summers et al., 2000)) wird von einer Ökonomisierung des ATP-Verbrauchs begleitet. Dazu zählt ein effizienterer Saccharoseabbau durch Saccharosesynthasen (SUS) bei limitierter Zuckerverfügbarkeit (Guglielminetti et al., 1995; Bieniawska et al., 2007; Santaniello et al., 2014), die Priorisierung von Pyrophosphat- statt ATP-abhängigen Enzymen (Mustroph et al., 2005; Huang et al., 2008), der reduzierte Abbau von Speichermolekülen (Geigenberger, 2003) und eine Repression der Proteinbiosynthese (Branco-Price et al., 2008).

1.2.2. Transkriptionelle Antwort auf Hypoxiestress und dessen Bedeutung

Die stark reduzierte Diffusionsrate von Gasen bei Überflutung hat unter anderem zur Folge, dass das gasförmige Phytohormon Ethylen im Gewebe akkumuliert (Métraux und Kende, 1983; Hattori et al., 2009). Die entgegengesetzten Strategien *Escape* und *Quiescence* werden beide durch Ethylen induziert (Fukao et al., 2006; Hattori et al., 2009). In Tiefwasserreis führt die ethylenvermittelte transkriptionelle Aktivierung von *SNORKEL1* und *2* (*SK1/SK2*), welche zur Gruppe VII der *Ethylen Responsive Factors* (*group VII-ERFs*) gehören, zur Akkumulation von Gibberellinsäure (GA) und damit zur Internodienelongation (Hattori et al., 2009). Andere tolerante Reis-*Accessions*, wie FR13A, reduzieren ihr Wachstum unter Überflutungsbedingungen durch die ethylenvermittelte Induktion eines Allels des *group VII-ERF* Transkriptionsfaktors *Submergence 1 A* (*SUB1A*) (Fukao et al., 2006; Xu

et al., 2006). SUB1A aktiviert die GA-Signaltransduktionsrepressoren *SLENDER RICE 1* (*SLR1*) und *SLR1 Like-1* (*SLRL1*) transkriptionell, was zur Inhibition der Internodienelongation führt (Fukao und Bailey-Serres, 2008). Außerdem werden bei Überflutung etwa 900 andere Gene durch SUB1A differentiell reguliert, welche unter anderem bei anaeroben Stoffwechselprozessen, Hormonantworten und in antioxidativen Systemen involviert sind (Jung et al., 2010).

Trotz der essenziellen Rolle von Ethylen bei der Anpassung an Überflutungsbedingungen führt künstlich herbeigeführter Sauerstoffmangel allein ebenfalls zur dramatischen Genexpressionsänderung in Reis (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007; Narsai et al., 2009) und *Arabidopsis* (Klok et al., 2002; Branco-Price et al., 2005; Liu et al., 2005; Loreti et al., 2005; Branco-Price et al., 2008; van Dongen et al., 2009; Mustroph et al., 2009). Ein Vergleich von Transkriptomdaten verschiedener Pflanzenspezies unter Sauerstoffmangel enthüllte die Konserviertheit der transkriptionellen Hypoxieantwort und führte im Speziellen zur Identifikation von orthologen Genen, welche mit Saccharoseabbau, Glykolyse, alkoholischer Gärung und ROS-Detoxifikation assoziiert werden (Mustroph et al., 2010). Der Einfluss von Gärung und Glykolyse auf das Überleben unter Sauerstoffmangel, durch die Induktion von *ADH1*, *PDC1* und *SUS*-Genen, ist allgemein anerkannt (Ellis et al., 1999; Rahman et al., 2001; Ismond et al., 2003; Kürsteiner et al., 2003; Bieniawska et al., 2007). Zell- und gewebspezifische Analysen der transkriptionellen Aktivierung unter Hypoxie in *Arabidopsis* führten zur Definition eines Kern-Sets an 49 Genen, welche ubiquitär transkriptionell induziert und translatiert werden („Hypoxie core Gene“) (Mustroph et al., 2009). Darunter befinden sich etablierte Hypoxiemarkergene, sowie ein Anteil von etwa 50 % mit noch unbekannter Genfunktion (HUP) (Mustroph et al., 2009). Die Tatsache, dass HUP-orthologe Gene ebenfalls hypoxieresponsiv sind, deutet auf essenzielle Funktionen unter Sauerstoffmangel hin (Mustroph et al., 2010). Tatsächlich wurden durch Überexpressionen und *knock outs* von HUPs, wie *AT1G33055*, *AT1G74940*, *At5g10040* und *AT5G66985*, deren Relevanz für die Überlebensfähigkeit von *Arabidopsis* unter Hypoxiestress demonstriert (Mustroph et al., 2010; Lee et al., 2011; Luhua et al., 2013).

Neben Genen, deren Translationsprodukte den Metabolismus direkt beeinflussen, sind regulatorische Proteine, wie Transkriptionsfaktoren (TFs), Ziele der konservierten Hypoxieantwort (Mustroph et al., 2010). TFs aus mindestens 17 Familien werden in *Arabidopsis thaliana* bei Sauerstoffmangel verstärkt transkribiert, was auf ein komplexes trans-regulatorisches Netzwerk hindeutet (Mustroph et al., 2009; Licausi et al., 2011c). Pathogenantwort-assoziierte WRKY TFs sind unter hypoxieresponsiven TFs angereichert, was eine wichtige Rolle der Pathogenabwehr während Überflutung oder Staunässe impliziert (Mustroph et al., 2009). Tatsächlich wird *WRKY22* in *Arabidopsis thaliana* durch Überflutung

und Hypoxie induziert und erhöht über die Aktivierung von Immunitätsmarkergenen die Resistenz gegenüber bakteriellen Pathogenen (Hsu et al., 2013). Promotoren von Hypoxie *core* Genen aus *Arabidopsis* enthalten MYB- Konsensussequenzen, und AtMYB2 ist in der Lage, den *ADH1*-Promotor zu aktivieren (Hoeren et al., 1998). Die generelle Beteiligung von MYB TFs an der Hypoxieantwort wurde auch in anderen Spezies demonstriert (Lee et al., 2007; Mattana et al., 2007). Die TFs VERNALISATION INSENSITIVE 3, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102 und HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A2 werden in *Arabidopsis* durch Sauerstoffmangel aktiviert und verstärken die Überlebensfähigkeit unter Hypoxiestress, agieren dabei aber außerhalb der Hypoxie *core*-Antwort (Bond et al., 2009; Christianson et al., 2009; Banti et al., 2010).

Unter allen hypoxieresponsiven TFs sind Mitglieder der AP2/ERF-Familie am stärksten vertreten (Mustroph et al., 2009; Licausi et al., 2011c). Darunter sind die *group* VII-ERFs, zu welchen auch SUB1A und SK1/2 gehören, bisher am intensivsten untersucht worden (Xu et al., 2006; Fukao und Bailey-Serres, 2008; Hattori et al., 2009; Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2014).

1.3. Group VII-ERF Transkriptionsfaktoren und Sauerstoffwahrnehmung in *Arabidopsis thaliana*

Group VII-ERFs sind durch ein evolutionär konserviertes, N-terminales MCGGAI/L Motiv (MC-Motiv) gekennzeichnet (Nakano et al., 2006). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* liegen fünf Mitglieder der *group* VII-ERFs vor, von welchen zwei, *Hypoxia Responsive ERF1* (*HRE1*) und *HRE2*, unter Sauerstoffmangel transkriptionell induziert werden (Licausi et al., 2010). Die anderen Mitglieder, *Related To Apetala 2 2* (*RAP2.2*), *RAP2.12* und *RAP2.3* zeigen bereits unter ambienten Sauerstoffbedingungen relativ starke transkriptionelle Aktivitäten (Büttner und Singh, 1997; Papdi et al., 2008; Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010).

1.3.1. Hypoxieinduzierte *group* VII-ERF Transkriptionsfaktoren HRE1 und HRE2

Unter den *group* VII-ERF TFs in *Arabidopsis thaliana* weisen *Hypoxia Responsive ERF Transcription Factor 1* und *2* (*HRE1* und *HRE2*) die größten Ähnlichkeiten zu *SUB1A* auf (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2011b). Mittels quantitativer *Realtime* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) konnte nachgewiesen werden, dass ihre Transkripte durch Sauerstoffmangel stärker akkumulieren als durch andere abiotische Stresse und Stimuli (Licausi et al., 2010; Park et al., 2011), während die von *RAP2.2*, *RAP2.3* und *RAP2.12* bereits bei Normoxie konstitutiv angereichert sind (Loreti et al., 2005; van Dongen et al., 2009; Licausi et al., 2010). Darüber hinaus sind beide kernlokalisierte Transkriptionsaktivatoren (Licausi et al., 2010; Park et al., 2011; Seok et al., 2014). Durch

diese Eigenschaften wurden HRE1 und HRE2 einerseits bezüglich des Mechanismus ihrer eigenen Transkription und andererseits bezüglich ihrer Rolle bei der Sauerstoffmangelantwort untersucht.

HRE1 und *HRE2* unterscheiden sich deutlich im räumlichen Muster und im Mechanismus ihrer transkriptionellen Hypoxieantwort (Licausi et al., 2010). Das *HRE1*-Transkript akkumuliert in hypoxiebehandelten Keimlingen ausschließlich in der Wurzel, während *HRE2*-Transkripte in der gesamten Pflanze akkumulieren (Licausi et al., 2010). Ein weiterer Unterschied zwischen der transkriptionellen Aktivierung von *HRE1* und *HRE2* besteht darin, dass nur *HRE1* durch Ethylen aktiviert werden kann, was sich additiv auf dessen Hypoxieantwort auswirkt, für diese aber nicht essenziell ist (Hess et al., 2011; Yang et al., 2011).

Für HRE1 und HRE2 konnten sowohl distinkte als auch gemeinsame Funktionen bei Hormon- und Stressantworten entschlüsselt werden (Licausi et al., 2010; Hess et al., 2011; Park et al., 2011; Yang et al., 2011). Das *HRE2*-Transkript ist während osmotischem Stress angereichert, was einen positiven Einfluss auf die Vitalität von *Arabidopsis*-Keimlingen unter diesen Bedingungen hat (Park et al., 2011). *HRE1*-RNAi-Linien zeigen nach 4 d Dunkelkeimung in Anwesenheit von Ethylen einen extrem kurvigen Winkel des Hypokotylhakens, was auf einen negativen Effekt von HRE1 auf die Ethylensignaltransduktion schließen lässt (Yang et al., 2011). Auf das Überleben von *Arabidopsis thaliana* unter Sauerstoffmangelbedingungen hingegen, scheinen beide Faktoren einen redundant positiven Einfluss zu haben (Licausi et al., 2010; Park et al., 2011; Seok et al., 2014). Vier Wochen alte Linien mit einer konstitutiven Überexpression von *HRE2* oder einer *HRE1*-Spleißvariante überleben unter Überflutungsbedingungen länger als der zugehörige Wildtyp (Park et al., 2011; Seok et al., 2014). Ähnliche Resultate ergeben sich bei der Hypoxie- oder Anoxie-Behandlung von Keimlingen (Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011). Einzelmutationen beider Gene führen im Vergleich zum Wildtyp nicht zu einer niedrigeren Überlebensrate unter Anoxie. Erst die Doppelmutation beider Gene ist anoxiasensitiv, was eine funktionelle Redundanz beider Faktoren für das Überleben unter Sauerstoffmangel untermauert (Licausi et al., 2010).

Als TFs sind *HRE1* und *HRE2* selbst an der Aktivierung und Reprimierung von Genen beteiligt (Licausi et al., 2010; Hess et al., 2011; Yang et al., 2011). Es ist wahrscheinlich, dass die funktionelle Redundanz von homologen TFs auf der Regulation gleicher Zielgene beruht (Bernard et al., 2012). In unabhängigen Experimenten mit *HRE*-Überexpressionslinien konnte jedoch gezeigt werden, dass nur HRE1 einen positiven Einfluss auf die Transkription und die Enzymaktivität des Hypoxiemarkergens *ADH1* unter Hypoxie hat (Licausi et al., 2010; Hess et al., 2011). Auch weitere hypoxieresponsive Gene, wie zum Beispiel *PDC1*,

SUS1, *SUS4* und *HÄMOGLOBIN 1 (HB1)* werden in Sauerstoffmangel-behandelten *HRE1* Überexpressionslinien verstärkt transkribiert (Licausi et al., 2010). Die Relevanz der HRE1-vermittelten transkriptionellen Aktivierung unter Sauerstoffmangel konnte mittels *hre1*-Mutanten und RNAi-Linien bestätigt werden, in welchen Hypoxiemarkergene weniger stark transkribiert werden als im Wildtyp (Hess et al., 2011; Yang et al., 2011). Interessanterweise sind typische Hypoxiemarkergene, wie *ADH1*, *PDC1*, *HB1* und Gene von noch unbekannter Funktion in einer *HRE2*-Überexpressionslinie unter ambienten Bedingungen schwächer exprimiert als im Wildtyp (Licausi et al., 2010). Aber aufgrund der Tatsache, dass diese Gene im genetischen Hintergrund der *HRE2*-Überexpression unter Hypoxie keine Veränderung zeigen, schlossen die Autoren eine Repressoreigenschaft von HRE2 auf diese Gene aus (Licausi et al., 2011b). Es wäre jedoch denkbar, dass HRE2 die Transkription bestimmter Faktoren bei Wiederbelüftung abschaltet, um eine konstitutive Sauerstoffmangelantwort zu verhindern. Es wurde impliziert, dass die Repression der transkriptionellen Hypoxieantwort bei Wiederbelüftung ebenso überlebenswichtig sei, wie dessen Induktion (Licausi et al., 2010). Gegen die Hypothese der sauerstoffabhängigen Repressoreigenschaft von HRE2 spricht einerseits, dass es in Anwesenheit von Sauerstoff degradiert wird (Gibbs et al., 2011) und andererseits, dass bei anhaltendem Hypoxiezustand die *hre1/hre2* Doppelmutante eine Herabregulation von Hypoxiemarkergenen zeigt, was in diesem Experiment nicht bei den jeweiligen Einzelmутanten beobachtet wurde (Licausi et al., 2010). Demnach hätte HRE2, wie HRE1, einen positiven Einfluss auf hypoxieresponsive Gene, um unter langanhaltenden hypoxischen Bedingungen deren Transkription aufrecht zu erhalten. Es bleibt fraglich, ob die Redundanz von HRE1 und HRE2 beim Überleben unter Sauerstoffmangel auf gleichen oder auf unterschiedlichen Regulationswegen beruht.

1.3.2. Konstitutiv transkribierte *group VII*-ERF Transkriptionsfaktoren RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12

Wie HRE1 und HRE2 sind RAP2.2 und RAP2.12 transkriptionelle Aktivatoren (Welsch et al., 2007; Park et al., 2011; Licausi et al., 2011b; Seok et al., 2014). Unter den *Arabidopsis group VII*-ERFs weisen sie zueinander die stärkste Homologie auf (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2011b). Darüber hinaus gilt RAP2.12 als stark konserviert, da in entfernten Spezies zu RAP2.12 orthologe Gene existieren (Licausi et al., 2011b).

Quantitative PCR-Experimente zeigen, dass das *RAP2.2*-Transkript unter belichteten, aeroben Bedingungen konstitutiv stark in Wurzelgewebe angereichert und schwächer in oberirdischen Pflanzenorganen exprimiert ist (Hinz et al., 2010). Durch Dunkelheit, aber nicht durch Hypoxie, ist es auch im Spross angereichert. Mittels eines GUS-Reporterassays konnte gezeigt werden, dass der *RAP2.2*-Promotor für diese Dunkelantwort ausreicht. Im Gegensatz dazu ist *RAP2.12* transkriptionell stark in allen Pflanzengeweben aktiviert (Licausi

et al., 2011b), wobei in Wurzeln, Blütenknospen und Stängeln eine noch höhere Transkriptakkumulation beobachtet werden kann als in anderen Geweben (Papdi et al., 2008). Es gibt außerdem Hinweise, dass *RAP2.12* schwach hypoxieresponsiv ist (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2011b). Ethylen und eine konstitutive Ethylensignaltransduktion können die Transkription von *RAP2.2* aktivieren (Hinz et al., 2010), während die Gabe des Ethylenausgangsstoffes 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) auf *RAP2.12* keinen Einfluss hat (Licausi et al., 2011b). Wie *RAP2.2* und *RAP2.12* ist das *RAP2.3*-Transkript bereits unter einer normalen Sauerstoffatmosphäre angereichert und zeigt keine deutliche Akkumulation unter Hypoxie (Licausi et al., 2010; Papdi et al., 2015).

Alle drei TFs üben einen positiven Einfluss auf die Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegenüber Sauerstoffmangelbedingungen aus (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2011b; Papdi et al., 2015). *RAP2.2*-Überexpressionslinien überleben künstliche Hypoxiebedingungen länger als der Wildtyp, während Linien mit verminderter *RAP2.2*-Transkriptmenge schlechtere Überlebensraten zeigen (Hinz et al., 2010; Papdi et al., 2015). Gleichmaßen können *RAP2.12*-Überexpressionspflanzen Hypoxie und einen Überflutungszustand länger überdauern, als wildtypische Vergleichspflanzen (Licausi et al., 2011b; Papdi et al., 2015). Es ist wahrscheinlich, dass die redundanten Funktionen von *RAP2.2*, *RAP2.3* und *RAP2.12* auf der Regulation gleicher Zielgene beruht. Interessanterweise hat die stabile Überexpression der Wildtypform von *RAP2.2* in *Arabidopsis thaliana* keinen Einfluss auf dessen Proteinabundanz in aerobem, photosynthetisch aktivem Gewebe und resultiert nicht in einer differenziellen Genexpression (Welsch et al., 2007). Erst unter Hypoxiebedingungen zeigen sich in Überexpressionslinien höhere Transkriptmengen und Enzymaktivitäten für die Hypoxiemarkergene *ADH1* und *PDC1*, als in hypoxiebehandelten Wildtyppflanzen (Hinz et al., 2010). Auch die konstitutive Überexpression der Wildtypformen von *RAP2.12* und *RAP2.3* resultiert nicht unter aeroben, sondern erst unter hypoxischen Bedingungen in einer positiven Expressionsänderung von Hypoxiemarkergenen, relativ zu Vergleichspflanzen (Licausi et al., 2011b; Papdi et al., 2015). Zu dieser Beobachtung passt, dass eine fluoreszenzmarkierte Version von *RAP2.12* (*RAP2.12:GFP*) unter ambienten Bedingungen nicht nuklear, sondern an der Plasmamembran lokalisiert ist, hypoxieabhängig in den Zellkern migriert und bei Wiederbelüftung degradiert wird (Licausi et al., 2011b). Eine nukleare Exklusion von *RAP2.12* unter Normoxie verhindert also dessen transaktivierende Wirkung.

1.3.3. Group VII-ERF Transkriptionsfaktoren als Substrate des *N-end rule pathways*

Bestimmte N-terminale Aminosäurereste können von Komponenten des *N-end rule Pathways* (NERP) erkannt werden, was zur Degradation des zugehörigen Proteins führt (Abbildung 1). Abhängig von der Anzahl zum Abbau führender enzymatischer

Modifikationsschritte am N-terminus, wird letzterer entweder als primär-, sekundär- oder tertiär- destabilisierender Rest bezeichnet. Primäre destabilisierende Reste werden von E3-Ubiquitinligasen PROTEOLYSIS 6 (PRT6) oder PRT1 erkannt, woraufhin das Zielprotein ubiquitiniert und so für den Abbau im 26S Proteasom gekennzeichnet wird. Arg stellt eine von 3 PRT6-spezifischen Aminosäuren dar und kann durch arginyl-tRNA:protein Arginyltransferasen 1 (ATE1) und ATE2 an sekundär destabilisierende Reste, wie Asp, Glu oder oxidiertes Cys ligiert werden. Nicht oxidiertes Cys, sowie Asn und Gln stellen tertiär destabilisierende Reste dar. Durch Endopeptidasen und Met-Aminopeptidasen kann eine Aminosäure posttranslational zum N-terminalen, destabilisierenden Rest werden (Zusammengefasst in Sriram et al., (2011)).

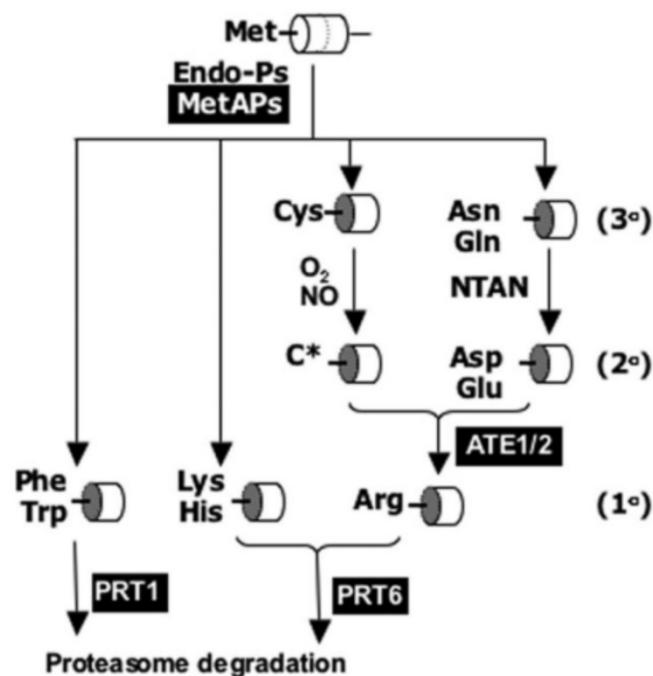


Abbildung 1 Der N-end rule Pathway zur Proteindegradation Primäre (1°), sekundäre (2°) oder tertiäre (3°) destabilisierende Aminosäurereste können durch Methionin-aminopetidasen (MetAPs) oder spezifische Endopeptidasen (Endo-Ps) N-terminal exponiert werden. Tertiäre destabilisierende Reste Asn und Gln können enzymatisch durch aminoterminalen Amidohydrolasen (NTAN) modifiziert werden. Cys-Reste können durch Stickstoffmonoxid (NO) oder Sauerstoff (O₂) chemisch oder enzymatisch zu sekundär-destabilisierenden Resten umgewandelt werden. Sekundär-destabilisierende Reste werden durch arginyl-tRNA:protein Arginyltransferasen 1/2 (ATE1/2) zu primären destabilisierenden Resten arginyliert. Primär destabilisierende Lys-, His- und Arg-Reste werden durch Proteolysis 6 (PRT6) erkannt und das Protein wird durch Ubiquitinierung zum Abbau im 26S Proteasom markiert. PRT1 erkennt analog Phe- und Trp-Reste. Die Abbildung wurde aus Holman et al., (2009) entnommen.

Wie alle *group VII*-ERFs besitzt RAP2.12 ein hoch konserviertes N-terminales Motiv, welches an zweiter Stelle ein Cystein (Cys) aufweist (Nakano et al., 2006). Die Manipulation des N-terminus von RAP2.12 durch die Fusion eines Hämagglutinin Epitops (HA-tag), dem

Austausch des Cys durch Alanin (Ala), oder die Entfernung des gesamten konservierten Motivs führen zu einer Verhinderung der Degradation und zur stabilen nuklearen Akkumulation von RAP2.12, unabhängig von wechselnden Sauerstoffbedingungen (Licausi et al., 2011b). Die Stabilisierung des TFs führt zur konstitutiven Aktivierung einer Vielzahl von Hypoxiemarkergenen unter aeroben Bedingungen sowie während Sauerstoffmangel und weiterhin nach Wiederbelüftung (Licausi et al., 2011b). Die NERP-Mutanten *prt6* und *ate1/2* zeigen ebenfalls eine konstitutive Anreicherung der mRNA von Hypoxiemarkergenen unter Normoxie (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Im gleichen genetischen Hintergrund besitzt die wildtypische Variante von RAP2.12 ein ähnliches subzelluläres Verteilungsmuster wie eine stabilisierte Version im Wildtyphintergrund (Licausi et al., 2011b). Diese Beobachtungen lassen RAP2.12 und weitere *group VII*-ERFs als mögliche Substrate des NERP erscheinen (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b).

Tatsächlich führt in einem *in vitro*-System die Applikation des NERP-kompetitiven Dipeptides Arg-b-Ala, sowie eine N-terminale Cys-zu-Ala-Mutation zur Stabilisierung aller *group VII*-ERFs von *Arabidopsis thaliana* (Gibbs et al., 2011). Dies wird dadurch bestätigt, dass die Wildtypform von HRE2 *in planta* durch Hypoxie oder im belüfteten *prt6* Hintergrund stabilisiert wird. N-terminal modifizierte Formen von HRE1 und HRE2 sind zudem bereits im belüfteten Col-0 Wildtyp stabilisiert, was sich bei langanhaltenden Hypoxiebedingungen positiv auf die Überlebensrate auswirkt (Gibbs et al., 2011). Die Akkumulation des Translationsproduktes von *RAP2.12* ist im Wildtyp hypoxieabhängig, aber in *prt6* oder *ate1/2* konstitutiv zu beobachten (Licausi et al., 2011b). Dass der N-terminus von RAP2.12 für dessen sauerstoffmangelabhängige Stabilisierung ausreicht, konnte schließlich anhand einer N-terminalen Fusion dieses Motivs an eine Firefly Luziferase (fLUC) demonstriert werden. Bei anhaltendem Hypoxiezustand steigt die LUC-Aktivität und sinkt nach Wiederbelüftung wieder ab (Licausi et al., 2011b).

Der aktuellen Theorie zur Sauerstoffwahrnehmung zufolge wird das initiale Methionin der *group VII*-ERFs durch METHIONIN AMINOPEPTIDASEN 1 und 2 (MAP1/2) abgespalten, wodurch ein exponiertes Cystein an Position 1 des Proteins zurück bleibt (Gibbs et al., 2014). Durch die PLANT CYSTEIN OXIDASEN 1 und 2 (PCO1 und 2) wird das N-terminale Cystein in Abhängigkeit von molekularem Sauerstoff oxidiert (Weits et al., 2014). Darauf folgt ein Arginylierungsschritt, welcher durch ATE1 und ATE2 vermittelt wird (Graciet et al., 2010). Der primär destabilisierende basische Rest Arg-Cys^{ox} am N-Terminus wird von der E3-Ubiquitinligase PRT6 erkannt, welche den TF ubiquitiniert und somit für den proteolytischen Abbau im 26S-Proteasom markiert (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Unter reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit verläuft die sauerstoffabhängige Cysteinoxidation ineffizient, was zur Akkumulation von *group VII*-ERFs führt (Gibbs et al., 2011; Licausi et al.,

2011b; Kosmacz et al., 2014; Weits et al., 2014). Sauerstoffmangelabhängige Freisetzung von *group VII*-ERFs in das Cytosol (demonstriert für RAP2.12) (Licausi et al., 2011b; Kosmacz et al., 2014), sowie deren Stabilisierung durch einen defekten NERP, führen schließlich zur verstärkten Aktivierung von Hypoxie *core* Genen im Nukleus (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b).

1.3.4. Redundanz und Hierarchie von *group VII*-ERF Transkriptionsfaktoren

Obwohl HRE1 und HRE2 wichtige Rollen bei der Sauerstoffmangelantwort spielen, können sie nicht als Initiatoren derselben gelten. Dies liegt einerseits daran, dass sie eine geringe Basalexpression zeigen und erst durch Hypoxie induziert werden, was einen vorangeschaltetes Signal zur Transkriptionsänderung impliziert (Licausi et al., 2010; Park et al., 2011). Zum anderen kann eine unverändert starke Aktivierung von Hypoxiemarkergenen in *hre1/hre2*-Mutanten beobachtet werden (Licausi et al., 2010). Es ist wahrscheinlicher, dass konstitutiv aktive Mitglieder der *group VII*-ERFs für die initiale Aktivierung von Hypoxiemarkergenen unter Sauerstoffmangel verantwortlich sind (Licausi et al., 2011b).

Die Aktivierung von hypoxieresponsiven Genen durch RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12 wurde mehrfach belegt (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2011b; Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015). Es gibt Hinweise darauf, dass dies auf einer Interaktion der TFs mit den Promotoren der Zielgene beruht (Papdi et al., 2008; Licausi et al., 2011b; Weits et al., 2014; Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015). Dass diese Eigenschaft tatsächlich eine Relevanz unter Sauerstoffmangel hat, ist durch Transkriptanalysen einer *rap2.3 knock out*-Linie (Papdi et al., 2015), *rap2.2 knock down*-Linien (Hinz et al., 2010) sowie amiRNA- und T-DNA doppel-*knock down*-Linien mit verminderten Transkriptmengen von *RAP2.2* und *RAP2.12* (Licausi et al., 2011b; Bui et al., 2015) belegt. In diesen Pflanzen ist die Anreicherung der mRNA von Hypoxiemarkergenen unter Sauerstoffmangel zwar präsent, aber schwächer ausgeprägt als im Wildtyp (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2011b; Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015). Dass in den *RAP2.2* und *RAP2.12* betreffenden Genotypen keine vollständige Inhibition der Hypoxieantwort stattfindet, kann entweder an der redundanten Beteiligung eines dritten Faktors, wie RAP2.3, liegen oder am positiven Einfluss des Resttranskriptes von *RAP2.2* oder *RAP2.12*. Es wurde bis heute nicht untersucht, ob Nullallele für *RAP2.2* und *RAP2.12* zu einem Verlust der Hypoxieantwort führen oder ob andere Faktoren, wie RAP2.3, für das Fehlen beider Gene kompensieren können.

Es wurde vermutet, dass *HRE2* unter ambienten Bedingungen konstitutiv transkribiert und posttranskriptional degradiert wird. Demnach soll es erst unter Sauerstoffmangel auf Transkriptebene stabilisiert werden (Licausi et al., 2010). Dies steht jedoch im Widerspruch zu der Tatsache, dass die Promotorsequenzen von *HRE1* und *HRE2* ausreichen, um ein Reportergen unter Hypoxie zu aktivieren (Park et al., 2011; Yang, 2014). Das *HRE2*-

Transkript, aber nicht das von *HRE1* ist in einer *RAP2.12*-Überexpressionslinie konstitutiv angereichert (Licausi et al., 2011b). Zudem ist es in zwei unabhängigen *prt6*-Mutanten (Choy et al., 2008; Gibbs et al., 2011) sowie im genomischen Hintergrund von *ate1/2* (Gibbs et al., 2011) deutlich stärker angereichert als das von *HRE1*. Anders als bei *HRE2* bedarf es zur hypoxischen Aktivierung von *HRE1* der Neusynthese mindestens eines Proteins (Licausi et al., 2010). Diese Daten deuten darauf hin, dass *HRE2* ein primäres Zielgen vom posttranslational regulierten *RAP2.12* sein könnte und *HRE1* möglicherweise ein sekundäres Zielgen eines anderen NERP-Substrates darstellt. AtMYB2, ein TF, welcher in der Lage ist, den *ADH1*-Promotor aus *Arabidopsis* zu aktivieren (Hoeren et al., 1998), konnte bereits als Aktivator für *HRE1* ausgeschlossen werden (Licausi et al., 2010). Bis heute wurden keine direkten Regulatoren für die transkriptionelle Aktivierung von *HRE1* und *HRE2* unter Sauerstoffmangel gefunden.

1.4. Transkriptionelle Repression während und nach Sauerstoffmangel

Bei Wiederbelüftung nach Hypoxie erfolgt eine Abnahme der Transkriptlevel hypoxieresponsiver Gene (Branco-Price et al., 2008), ein Prozess, der in *Arabidopsis* bereits nach 15 min einsetzt und 4 h dauert (Kosmacz et al., 2014). Dieser regulatorische Schritt ist wahrscheinlich ebenso entscheidend für das Überleben nach anhaltenden Überflutungsbedingungen, wie die adäquate Induktion von Hypoxiemarkergenen während des Stresses (Licausi et al., 2011b). Aufgrund des rapiden Rückgangs wird eine aktive Repression von hypoxieresponsiven Promotoren vermutet. Tatsächlich reicht die sauerstoffabhängige Degradation des *group VII*-ERF TFs *RAP2.12* (Licausi et al., 2011b) zur Erklärung des mRNA-Rückgangs nicht aus, da dieser bereits vor der sichtbaren Degradation von nuklearem *RAP2.12* eintritt (Kosmacz et al., 2014). Unter den hypoxieinduzierten Genen in *Arabidopsis thaliana* befinden sich Transkriptionsfaktoren mit vorhergesagten oder bestätigten Repressoreigenschaften (Mustroph et al., 2009; Licausi et al., 2011c; Giuntoli et al., 2014). Darunter stellt HYPOXIA RESPONSIVE ATTENUATOR 1 (*HRA1*) einen Faktor dar, welcher die Aktivität von *RAP2.12*, hauptsächlich durch physische Interaktion mit dem *group VII*-ERF TF, herabsenkt (Giuntoli et al., 2014). Neben dieser passiven Repressorfunktion verfügt *HRA1* möglicherweise auch über aktive negativ regulatorische Eigenschaften, da seine direkte Bindung an eine geringe Anzahl hypoxieresponsiver Promotoren, darunter am *HRA1* Promotor selbst, nachgewiesen wurde (Giuntoli et al., 2014). Das Aktionsspektrum von *HRA1* ist durch seine *RAP2.12*-Spezifität eingeschränkt. Außerdem konnte durch Modulation der *HRA1*-Expression nur die Regulation von 43 % der durch *RAP2.12* aktivierten Gene erklärt werden, und *HRA1* beeinflusst ausschließlich die Genregulation in meristematischem Gewebe und in jungen Blättern (Giuntoli et al., 2014). Ein *hra1*-Nullallel weist nach Wiederbelüftung signifikant mehr Resttranskript des Hypoxiemarkergens *ADH1* auf als der Wildtyp. Trotzdem findet in diesem genetischen

Hintergrund eine posthypoxische Herunterregulation der *ADH1* um den Faktor 5, und bei *PDC1* um den Faktor 10 statt (Giuntoli et al., 2014). Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass HRA1 zwar für eine regulatorische Repression unter Sauerstoffmangel, aber bei Wiederbelüftung keine ausschlaggebende Rolle spielt und somit nicht die posthypoxische Genrepression in Anwesenheit von nuklearem RAP2.12 erklärt (Giuntoli et al., 2014; Kosmacz et al., 2014). Andere TFs, besonders welche, die auch die Aktivität von RAP2.2 beeinträchtigen, könnten stattdessen für eine Repression unter Wiederbelüftung verantwortlich sein.

LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41 (LBD41) und orthologe Gene in anderen Spezies sind stark hypoxieinduziert (Mustroph et al., 2009; Mustroph et al., 2010). Der potenzielle TF besitzt ein vorhergesagtes *ERF-associated amphiphilic repression* (EAR) Motiv in seiner Proteinsequenz (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009). EAR-vermittelte Genrepression erfolgt über die Rekrutierung von Co-Repressoren wie SIN3 ASSOCIATED POLYPEPTIDE P18 (SAP18) und TOPLESS (TPL) (Kagale und Rozwadowski, 2011). Da LBD41 sowohl mit TPL, als auch mit TPL-RELATED (TPR) interagiert (Causier et al., 2012), könnte er als wichtiger Repressor während oder nach akutem Sauerstoffmangel fungieren. Trotz seiner konservierten Hypoxieinduktion wurde mittels eines Überlebensassays an einer *lbd41 knock out*-Linie bisher kein Hinweis auf eine LBD41-vermittelte Sauerstoffmangelresistenz in *Arabidopsis thaliana* gefunden (Luhua et al., 2013).

1.5. Die cis-Regulation der Sauerstoffmangelantwort

Die Regulation der Sauerstoffmangelantwort wurde bereits auf cis-Ebene untersucht, bevor transregulatorische Mechanismen derselben identifiziert wurden (Ellis et al., 1987; Paul et al., 1987). Die bisher unternommenen Versuche, ein oder mehrere Hypoxie- oder auch *group VII-ERF*-relevante cis-regulatorische Elemente (CREs) zu finden, kann in vier Herangehensweisen gegliedert werden. Dazu zählen computerbasierte Vorhersagen (Klok et al., 2002; Liu et al., 2005), die Promotorinduktion durch Sauerstoffmangel (Walker et al., 1987; Olive et al., 1990), die Promotorinduktion durch eine gezielte Transaktivierung (Hoeren et al., 1998; Licausi et al., 2011c) und der Nachweis direkter Protein-DNA-Interaktionen (Ferl, 1990; Olive et al., 1991; Welsch et al., 2007).

1.5.1. Computerbasierte Vorhersagen

Alle bisherigen *in silico* Vorhersagen von hypoxieregulierten Motiven basieren auf der Annahme, dass sie in co-regulierten Promotoren überrepräsentiert vorliegen (Klok et al., 2002; Liu et al., 2005; Mohanty et al., 2005; Licausi et al., 2010; Hsu et al., 2011; Licausi et al., 2011c; Mohanty et al., 2012). Hypoxieregulierte Gene wurden nach Kriterien wie positive oder negative Expression (Liu et al., 2005; Hsu et al., 2011; Licausi et al., 2011c; Mohanty et al., 2012), Expressionsstärke und Expressionsdauer (Klok et al., 2002; Licausi et al., 2011c),

sowie funktioneller Gemeinsamkeiten der Translationsprodukte (Mohanty et al., 2005; Mohanty et al., 2012) gruppiert und untersucht. Obwohl auch potenziell orthologe und paraloge Gene verschiedener Spezies, wie *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Petunia hybrida*, *Lycopersicon esculentum* und *Hordeum vulgare* auf Promotorebene verglichen wurden, wurde bis heute keine echte phylogenetische Analyse zur Verwandtschaft von hypoxieresponsiven Promotoren durchgeführt (Mohanty et al., 2005). Ein zentrales Motiv, welches in jeder bisher durchgeführten Motivvorhersage in hypoxieregulierten Genen bestimmt wurde, ist die MYB-Konsensussequenz AAACC(A). Trotzdem führte die Vorhersage von potenziell hypoxieregulierten Motiven bis heute nicht zur Identifikation eines funktionalen hypoxie-regulierten CREs. Im Gegensatz dazu ermöglichten molekularbiologische und biochemische Herangehensweisen die Identifikation und funktionelle Charakterisierung von CREs, welche im Zusammenhang mit Hypoxie stehen oder stehen könnten (Walker et al., 1987; Olive et al., 1990; Geffers et al., 2000; Geffers et al., 2001; Welsch et al., 2007; Gibbs et al., 2014; Wu et al., 2014). Die wichtigsten Promotorsequenzen, welche im Zusammenhang mit dem *group VII*-ERF regulierten Teil der Hypoxieantwort stehen könnten, sind die ATCTA Sequenz (Welsch et al., 2007) und das Anoxia Responsive Element (ARE) (Walker et al., 1987).

1.5.2. Die ATCTA Sequenz

Im Gegensatz zu RAP2.3 ist RAP2.2 nicht in der Lage, mit der GCC-Box, welche die klassische ERF-Bindestelle darstellt (Hao et al., 1998), zu interagieren (Büttner und Singh, 1997; Ou et al., 2011). Stattdessen interagiert es *in vitro* mit einer ATCTA-Kernsequenz, welche in Promotoren der Carotinoidbiosynthesegene *PHYTOENE SYNTHASE (PSY)* und *PHYTOENE DESATURASE (PDS)* auftaucht (Welsch et al., 2007). Die *de novo*-Vorhersage dieser Sequenz in hypoxieresponsiven Promotoren legt nahe, dass sie in diesen angereichert vorliegt (Hsu et al., 2011; Licausi et al., 2011c). Zudem können ATCTA-enthaltende Promotoren durch RAP2.2 und RAP2.12 aktiviert werden (Papdi et al., 2008; Licausi et al., 2011b; Giuntoli et al., 2014; Weits et al., 2014). Jedoch wird die Hypoxierelevanz dieser Promotorsequenz dadurch infrage gestellt, dass *PSY*- und *PDS*-Transkripte weder in NERP-Mutanten noch durch *RAP2.2*- oder *RAP2.12*-Überexpression, oder unter Sauerstoffmangel anreichert sind (Mustroph et al., 2009; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Bisher wurden keine spezifischen Promotordeletionen oder Substitutionen durchgeführt, welche die Relevanz der ATCTA-Sequenz für die Funktion von RAP2.2 oder RAP2.12 oder für hypoxische Genregulation bestätigten (Licausi et al., 2011b).

1.5.3. Das Anoxia Responsive Element (ARE)

Im Gegensatz zur ATCTA-Sequenz ist für das ARE bereits bekannt, dass es nötig und ausreichend für die transkriptionelle Geninduktion unter Sauerstoffmangel ist (Walker et al.,

1987). Das ARE der *ADH1* aus Mais liegt in einer DNaseI-hypersensitiven Promotorregion und funktioniert in beiden Orientierungen (Paul et al., 1987; Walker et al., 1987; Olive et al., 1990). Es besteht aus zwei Subregionen, wobei die Abwesenheit einer Subregion die Funktion der jeweils anderen negativ beeinflusst (Walker et al., 1987; Olive et al., 1990). In unabhängigen Untersuchungen wurden Sequenzen gefunden, welche von nuklearen Proteinen gebunden werden und mit beiden Subregionen überlappen (Fertl und Nick, 1987; Fertl, 1990; Olive et al., 1991). Jede der Subregionen besteht aus einer GC-reichen Region (GC(G/C)CC), welche später als GC-Motiv bezeichnet wurde (Walker et al., 1987; Dolferus et al., 1994). Eine *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)-Sonde, bestehend aus ARE-Concatemeren, zeigt eine Gelretardierung nach Inkubation mit nuklearem Maiszellextrakt. Diese Protein-DNA Bindung ist spezifisch für das GC-Motiv, was zur Postulierung des bis heute unbekannten GC-bindenden Proteins 1 (GCBP-1) führte (Olive et al., 1991). Angrenzend am GC-Motiv liegt ein GT-reiches Motiv ((T)GGTTT), welches revers komplementär (AAACC(A)) eine MYB-Transkriptionsfaktorenbindestelle (TFBS) darstellt (Walker et al., 1987; Hoeren et al., 1998). Das ARE-Homolog der *ADH1* aus *Arabidopsis thaliana* ist essenziell für stressabhängige Geninduktion und wird von AtMYB2 im GT-reichen Motiv gebunden (Dolferus et al., 1994; Hoeren et al., 1998). Dass MYB TFs bei der Hypoxieantwort eine wichtige Rolle spielen könnten, wird auch dadurch bestärkt, dass MYB-Konsensussequenzen in 5' stromaufwärts gelegenen Bereichen von hypoxieresponsiven Genen angereichert vorliegen (Klok et al., 2002; Liu et al., 2005; Mohanty et al., 2005; Licausi et al., 2011c). Obwohl auch GC-reiche Regionen in hypoxieresponsiven Promotoren angereichert vorliegen, konnte ihre Nähe zu GT-reichen Motiven, wie es beim ARE der Fall ist, für die meisten Hypoxiemarkergene nicht bestätigt werden (Klok et al., 2002). Dies suggeriert, dass das ARE auf eine kleine Anzahl von hypoxieresponsiven Genen beschränkt ist und nicht zur Erklärung der Haupt-Hypoxieantwort beiträgt. Damit übereinstimmend wird die Relevanz des AtMYB2 durch die Entdeckung von *group VII*-ERFs als starke Regulatoren der Hypoxieantwort infrage gestellt (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Tatsächlich ist *AtMYB2* kein Zielgen der Sauerstoffmangelantwort, und das *ADH1*-Transkript weist unter Hypoxie eine wildtypische Akkumulation im *atmyb2* Mutantenhintergrund auf (Klok et al., 2002; Licausi et al., 2010).

1.5.4. Alternative cis-Elemente bei der Hypoxieantwort

Neben der ATCTA-Sequenz, dem ARE und einer Vielzahl vorhergesagter Motive existieren weitere CREs, welche entweder mit Hypoxie oder *group VII*-ERFs in Zusammenhang gebracht wurden. Die bekannteste ERF TFBS ist die GCC-Box (Hao et al., 1998). Da alle *group VII*-ERFs über die konservierte, GCC-Box bindende AP2-Domäne verfügen (Nakano et al., 2006), wurden die Bindungs- oder Aktivierungskapazitäten von RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12 zur GCC-Box untersucht (Büttner und Singh, 1997; Gibbs et al., 2014). Während

diese Interaktion für RAP2.3 mehrfach bestätigt wurde (Büttner und Singh, 1997; Wang et al., 2009a; Yang et al., 2009; Gibbs et al., 2014), gibt es für RAP2.2 widersprüchliche Befunde. In einem Transaktivierungssystem waren drei *group* VII-ERFs, darunter auch RAP2.2, dazu in der Lage, einen GCC-Box enthaltenden Promotor lediglich um etwa den Faktor 1,5 zu aktivieren. Zwar führt die Deletion der GCC-Boxen zur Abnahme dieser Transaktivitäten, jedoch gilt das auch für die Basalaktivität des Promotors, wodurch eine *group* VII-ERF-Spezifität des Aktivitätsverlustes nicht nachgewiesen werden kann (Gibbs et al., 2014). Darüber hinaus wurde für RAP2.2 in einem Hefe-1-hybrid (H1H) System keine GCC-Box-Interaktion bestätigt (Ou et al., 2011).

Neben der GCC-Box existieren weitere cis-Elemente, welche bisher nicht im Zusammenhang mit *group* VII-ERFs, jedoch mit Hypoxie stehen. In einem Reis-Reportersystem reichte die Kombination aus einer G-Box (CACGTG) und zwei Tandem TA-Boxen (TATCCA) aus, um die Induktion des α -Amylase 8-Promotors aus Reis unter Überflutungsbedingungen zu erhöhen (Wu et al., 2014). In einer anderen Untersuchung führte die Deletionskartierung des *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 4*-Gens aus Mais, in einem heterologen Reportersystem in Tabakzellen, zur Entdeckung einer 50 bp-langen hypoxieresponsiven Region mit einer im Nukleus gebundenen GTGGGCCCG-Kernsequenz (Geffers et al., 2000). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass eine benachbarte MYB-Konsensussequenz essenziell für die anaerobe Induktion dieser Region war (Geffers et al., 2001). Eine bestehende Analogie dieser Sequenz zum ARE der *ADH1* aus Mais wurde nicht überprüft (Geffers et al., 2000; Geffers et al., 2001). Diese widersprüchlichen Daten zur hypoxieabhängigen cis-/trans-Regulation lassen die Frage offen, über welche cis-regulatorischen Elemente hypoxieresponsive Gene aktiviert werden können.

1.6. Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, negative und positive Transregulatoren der Hypoxieantwort von *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Speziellen sollte ein Screening nach Transregulatoren eines zuvor isolierten hypoxieresponsiven Promotors durchgeführt werden, um anschließend die physiologische Relevanz für putative Repressoren hypoxieresponsiver Promotoren zu bestätigen. Darüber hinaus sollte der quantitative Einfluss von *group* VII-ERFs bei der redundanten Beteiligung an der zentralen Hypoxieantwort aufgeklärt werden. Über die molekulare und computerbasierte Lokalisation und Charakterisierung eines *group* VII-ERF regulierten cis-Elements galt es, den zugrundeliegenden Mechanismus der Redundanz von *group* VII-ERFs aufzuklären.

2. Materialien und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1. Pflanzenmaterial und Wachstumsbedingungen

Für alle reporterbasierten Experimente wurde der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) benutzt. Die *rap2.12*-Mutante Sail_1215_H10 besitzt eine T-DNA Insertion im zweiten Exon des genomischen Locus *At1g53910* in Col-0 (Sessions et al., 2002). Samen wurden durch das *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen. Die *rap2.2*-Mutante AY201781/ GT5337 trug eine Transposon-Insertion im zweiten Exon des genomischen Locus *At3g14230* in Landsberg erecta (Ler-0) und wurde vom Martienssen-Labor (Cold Spring Harbour Laboratory; Sundaresan et al., 1995) bezogen. Kreuzungen von *rap2.2*- und *rap2.12*-Mutanten zur Generation homozygoter Mutanten- und Wildtypallele im Col-0/Ler-0 Hintergrund wurden von Willi Riber durchgeführt. Im Zuge dieser Arbeit wurden sie wie folgt neu bezeichnet: *rap2.2xrap2.12#2-5-3* = *rap2.2/2.12A*, *rap2.2xrap2.12#2-5-13* = *rap2.2/2.12B*, Col-0xLer-0#2-5-9 = Col-0xLer-0A, Col-0xLer-0#2-5-12 = Col-0xLer-0A. Die *rrtf1*-Mutante SALK_150614 trägt eine T-DNA-Insertion in der intronfreien, kodierenden Sequenz von *RRTF1* und wurde vom NASC bezogen. Samen von *Arabidopsis lyrata* und *Capsella rubella* sowie der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Col-0, Catania (Ct-1), Cape Verde Islands (Cvi-0), Kaunas (Kn-0), Krotzenburg (Kro-0), Ler-0, Shakdara (Sha) und Spandau (Sp-0) stammten ebenfalls vom NASC. Sämtliche verwendeten transgenen Linien sind in Tabelle A 7 aufgelistet.

Außer für Protoplastenexperimente wurden Samen mittels Chlorgas (10 ml Natriumhypochlorit, 5 ml 37 %-ige Salzsäure) oberflächensterilisiert und dunkel unter Stratifikation für 3 Tage bei 4°C auf Murashige und Skoog (MS)-Salzen enthaltendem Medium (1x MS Salze, 0.8% [w/v] Agar, 1% [w/v] Saccharose, pH 5.7) imbibiert. Um Keimlinge für Transkriptanalysen zu erhalten, wurden stratifizierte Samen für 7 d unter Langtagbedingungen (23°C; 16h/8h hell/dunkel Zyklus; 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zur Keimung in senkrecht stehenden Platten inkubiert. Für Überlebensexperimente mit 5 d-alten Keimlingen wurde die Inkubationszeit verkürzt. Für Protoplastenexperimente wurden etwa 20 unsterilisierte *Arabidopsis thaliana* Samen pro Topf direkt auf Erde (3:3:1 Blumenerde (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa): Pikiererde (Okohum, Herbertingen): Vermiculit (dt. Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhoevel)) aufgebracht und für 3 d bei 4°C stratifiziert. Bis zur Verwendung wuchsen die Pflanzen für 3-4 Wochen unter Kurztagbedingungen (23°C; 8 h/16 h hell/dunkel Zyklus; 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Um 20 d alte Pflanzen für qualitative LUC Messungen *in vivo* zu erhalten, wurden 7 d-alte Keimlinge von MS Platten unter Langtagbedingungen auf Erde pikiert und unter

Kurztagbedingungen weiter angezogen. Dieselben Wachstumsbedingungen wurden für 3 Wochen alte Pflanzen angewandt, welche für Sauerstoffmangelbehandlung von Blattabschnitten benutzt wurden. Um die Überlebensrate nach Überflutung zu messen, wurden 7 d-alte Keimlinge von MS-Medium unter Langtag-Bedingungen auf ein Erde:Sand:Vermiculit (2:1:1) Gemisch überführt und unter Kurztagbedingungen für weitere 2 Wochen angezogen. Zur Pflanzentransformation wurden Keimlinge nach 7 d Wachstum auf MS-Medium unter Langtagbedingungen pikiert und bis zur Blüte auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen.

2.1.2. Mikroorganismen

Der Hefe-1-Hybrid (H1H) Stamm *Y1H-aS2* wurde freundlicherweise von Maria Walhout bereitgestellt (Reece-Hoyes et al., 2011). Die *Escherichia coli* (*E. coli*)- Stämme DB3.1 und DH10 β können bei Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bezogen werden. *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) Stamm GV3101 wurde von Genetello et al., (1977) beschrieben.

2.2. Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.1. Wasser

Für sämtliche Reaktionen, Lösungen und Puffer wurde ausschließlich Millipore gereinigtes Wasser (Advantage A10 Milli-Q-Anlage, Merck Millipore, Billerica, USA) verwendet.

2.2.2. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein Bio-Rad System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) benutzt. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 1 % [w/v] Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) in 1 x TAE Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20mM Essigsäure) unter Erhitzung gelöst. Vor dem Aushärten wurden entweder 1 μ l/ 50 ml SERVA DNA Stain G (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) oder 1 μ l/ 50 ml Ethidiumbromid beigemischt. Alternativ wurden Gele nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidfärbebad (70 μ l Ethidiumbromid/l in H₂O) für mindesten 10 min bei 60 rpm gefärbt. DNA- und RNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 6x *Loading Dye* (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) im Verhältnis 6:1 (DNA:*Loading Dye*) vermengt. Als DNA-Standard diente der *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), von welchem stets 6 μ l verwendet wurden. Als Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet. Die Laufspannung betrug 100 V und die Dauer wurde zwischen 10 min und 30 min variiert. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mittels CCD-Kamera (312 nm; Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

2.2.3. Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

50 mg frisches Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend mittels Kugelmühle pulverisiert (Retsch GmbH, Haan). Das Pulver wurde in Anwesenheit von 500 µl DNA-Extraktionspuffer (50 mM EDTA (pH 8.0); 100 mM Tris/HCl (pH 8.0); 500 mM NaCl; 0,2 % [w/v] SDS) aufgetaut und homogenisiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 65 °C wurden die Proben mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und für 30 sec gevortext. Nach Zentrifugation (12000 g, 15 min, Raumtemperatur) wurde die obere wässrige Phase sauber separiert und zur DNA-Fällung mit 500 µl Isopropanol gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Proben erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das gDNA-Pellet wurde mit 75 % [v/v] Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets wurde die gDNA in 50 µl H₂O ohne Anwendung von Scherkräften gelöst.

2.2.4. Isolation von RNA aus Pflanzen

50 - 100 mg gefrorenes Pflanzengewebe wurde mittels Kugelmühle pulverisiert (Retsch GmbH, Haan) und in Anwesenheit von 500 µl TRIsure (Bioline GmbH, Luckenwalde) aufgetaut und homogenisiert. Proben wurden für 5 min bei RT inkubiert, mit 100 µl Chloroform versetzt und für 15 sec gevortext. Nach Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C, Festwinkelrotor) wurde die wässrige Phase sauber separiert und mit 250 µl Isopropanol gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde erneut unter gleichen Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmalig mit 75 % [v/v] Ethanol gewaschen, für 5 min bei RT getrocknet und in 20 – 50 µl H₂O gelöst. Der Lösevorgang wurde durch Erhitzung bei 60 °C für 10 min, Pipettieren und Einfrieren bei -80 °C über Nacht (ÜN) unterstützt. RNA wurde bis zu Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.5. cDNA Synthese

Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, und die Quantifizierung erfolgte mittels NanoPhotometer (Implen GmbH, München). Zur cDNA-Synthese wurde die Konzentration der RNA aller Proben auf 1 µg eingestellt. Wenn das Maximalvolumen der RNA-Lösung von 11,5 µl weniger als 1 µg enthielt, wurde die höchst mögliche Konzentration der am schwächsten konzentrierten Probe gewählt. Zur RNA wurde 1 pmol Oligo(dT) (Invitrogen™/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert. Zur Reaktion wurden 4 µl 5x *Reaction Buffer* (RevertAid™ Reverse Transcriptase; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 0,5 µl (20 U) RiboLock™ RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 2 µl dNTP Mix (jeweils 10 mM Stammkonzentration) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und 1 µl (200 U) RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,

USA) zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 42 °C inkubiert und schließlich bei 70 °C für 10 min terminiert. cDNA wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.6. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

DNA (cDNA und gDNA) wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sequenzspezifisch amplifiziert. Die zyklische DNA Synthese erfolgte mittels eines *Thermocyclers* der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Zyklenschemata, Polymerasen und Reaktionsansätze wurden an experimentelle Anforderungen angepasst und sind den nachfolgenden Punkten zu entnehmen.

2.2.6.1. Für Klonierung und Sequenzierung

Für Klonierungen und Sequenzierungen wurde stets die Phusion™ High fidelity-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) benutzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 36 µl H₂O, 5 µl 2mM dNTP Mix, 10 µl 5xHF *buffer*, je 2,5 µl 10 µM *forward*- und *reverse* Primer, 1 µl DNA, 0,5 µl Phusion™ High fidelity Polymerase. Alle Reaktionskomponenten wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bezogen. Das Zyklenschema wurde wie folgt programmiert: Schritt 1: 98 °C 1 min, Schritt 2: 98 °C 30 sec, Schritt 3: T_m + 3°C 30 sec, Schritt 4: 72 °C 1 min/kb, Schritt 5: 35xWiederholung Schritt 2-4, Schritt 6: 72 °C 10 min, Schritt 7: 15 °C ∞. Ein Sonderfall der PCR für Klonierungszwecke ist die Gatewayklonierung und wird unter 2.2.12 erläutert.

2.2.6.2. Zur Insertion von Punktmutationen

Für *site directed mutagenesis* Experimente mit pBT10GAL4UAS-Derivaten wurden alle Bedingungen von Klonierungen und Sequenzierungen, bis auf das Zyklenschema, beibehalten. Letzteres wurde wie folgt geändert: Schritt 2: 98 °C 60 sec, Schritt 3: 55 °C 60 sec, Schritt 4: 72 °C 5 min, Schritt 5: 12xWiederholung Schritt 2-4, Schritt 6: entfiel.

2.2.6.3. Qualitativer und semiquantitativer Sequenznachweis und Kolonie-PCR

Für qualitative und semiquantitative Sequenznachweise wurde stets Taq-Polymerase (hergestellt am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth) in Kombination mit 10xPCR Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9,0, 1 % [v/v] Triton X-100) verwendet. Jeder Reaktionsansatz enthielt 17,75 µl H₂O, 2,5 µl 2mM dNTP-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer, je 0,5 µl 10 µM *forward*- und *reverse* Primer, 1 µl DNA und 0,25 µl Taq-Polymerase. Der dNTP-Mix und Primer wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bzw. Invitrogen™/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Das Zyklenschema wurde wie folgt programmiert: Schritt 1: 94 °C 1 min, Schritt 2: 94 °C 30 sec, Schritt 3: 55 °C 45 sec, Schritt 4: 72 °C 1 min/kb, Schritt 5: 30-35xWiederholung Schritt 2-4, Schritt 6: 72 °C 10 min, Schritt 7: 15 °C ∞. Um positive Klone zu verifizieren, wurde eine

Kolonie-PCR angewandt, bei welcher eine steril übertragene Kolonie und 1 µl H₂O das DNA *Template* ersetzen. Die initiale Denaturierungszeit wurde dazu auf 4 min erhöht.

2.2.7. Annealing von einzelsträngigen Oligonukleotiden

Zur Klonierung synthetischer Promotorconcatemere wurden partiell überlappende, komplementäre, einzelsträngige Sequenzen von maximal 100 bp Länge entworfen und über InvitrogenTM/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bestellt. Die Oligonukleotide wurden zu 100 µM in H₂O gelöst. Je 20 µl des Plus- und Minusstranges wurden zusammengeführt, auf 94 °C für 3 min erhitzt und zum *Annealing* bei RT für 30 min abgekühlt. Einzelsträngige Überhänge wurden mit Taq-Polymerase (Hergestellt am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie Bayreuth) für 1h bei 72 °C aufgefüllt (2 mM dNTP 5µl; 10 x PCR Puffer 5 µl; DNA 40 µl; Taq-Polymerase 0,5 µl). Anschließend wurden die doppelsträngigen Fragmente über eine Gelextraktion (siehe Punkt 2.2.10) aufgereinigt und für die Ligation (siehe Punkt 2.2.11) verdaut (siehe Punkt 2.2.8).

2.2.8. DNA-Restriktionsverdau

2.2.8.1. Präparativer Restriktionsverdau

Beim präparativen Verdau eines Vektors oder eines DNA-Fragmentes wurden bis zu 30 fmol DNA eingesetzt. Die Standard-Reaktionsbedingungen (DNA 40 µl; Enzym 25 U; 10 x Puffer 5 µl; H₂O zu 50 µl) wurden gemäß der Anleitung der Hersteller (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für jedes Enzym oder jede Enzymkombination angepasst. Die Restriktionsreaktion inkubierte für mindestens 3 h bei 37 °C und wurde durch eine Gelextraktion oder PCR-Aufreinigung (siehe Punkt 2.2.10) beendet.

2.2.8.2. Analytischer Restriktionsverdau

Beim analytischen Verdau eines Vektors wurden bis zu 0,7 fmol DNA eingesetzt. Wie beim präparativen Verdau wurden die Reaktionsbedingungen (DNA 2-4 µl; Enzym 5 U; 10 x Puffer 1 µl; H₂O zu 10 µl) gemäß der Anleitung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für jedes Enzym oder jede Enzymkombination angepasst. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1 h bei 37 °C. Der Restriktionsverdau wurde anschließend auf einem Agarosegel (siehe Punkt 2.2.2) analysiert.

2.2.9. Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Zur Dephosphorylierung von DNA zu Klonierungszwecken wurde mit Alkaliner Phosphatase, Calf Intestinal (Medison, WI, USA) nach Herstellerangaben behandelt.

2.2.10. DNA-Aufreinigung

Für Klonierungen und Sequenzierungen wurden aus Restriktionsverdau oder PCR stammende DNA-Fragmente entweder über ein Agarosegel mittels GeneJET Gel Extraction

Kit, oder direkt mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.11. Ligation

Vor der Ligation wurden anhand bekannter Markermengen DNA-Konzentrationen per Agarosegelelektrophorese abgeschätzt. Für die Ligationsreaktion wurde daraufhin ein 3:1 Mengenverhältnis zwischen Insert und Vektor verwendet. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA Ligase und 10xT4-DNA Ligase *buffer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) genutzt. Je Ligationsreaktion wurden folgende Komponenten auf Eis pipettiert: 25 ng Vektor, 75 ng Insert, 1 µl 10 x T4-DNA Ligase *buffer*, 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/µl), auf 10 µl mit H₂O. Die Inkubation erfolgte bei RT für mindestens 1 h und maximal ÜN 2,5 µl wurden in 50 µl chemisch kompetente *E.coli* Zellen transformiert.

2.2.12. Gateway-Klonierung

Zur Herstellung von pEntry-Vektoren wurde zunächst mittels sequenzspezifischen Primern, welche flankierende, partielle attB Rekombinationsstellen aufwiesen, aus gDNA, cDNA oder Plasmid-DNA amplifiziert. Dabei wurde das unter 2.2.6 beschriebene Protokoll für Klonierungen benutzt. Daraufhin wurden 10 µl des PCR-Ansatzes auf einem Agarosegel überprüft. Eine zweite PCR mit attB Adapter-Primern (attB1_fw und attB2_rev) und 1 µl des ersten Reaktionsansatzes wurde durchgeführt. Der Reaktionsansatz stimmte mit dem unter 2.2.6 beschriebenen Protokoll für Klonierungen überein. Das Zyklenschema wurde wie folgt programmiert: Schritt 1: 98 °C 1 min, Schritt 2: 98 °C 15 sec, Schritt 3: 45 °C 30 sec, Schritt 4: 72 °C 1 min/kb, Schritt 5: 5xWiederholung Schritt 2-4, Schritt 6: 98 °C 15 sec, Schritt 7: 55 °C 30 sec, Schritt 8: 72 °C 1 min/kb, Schritt 9: 20xWiederholung Schritt 6-8, Schritt 10: 15 °C ∞. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (siehe Schritt 2.2.10), mittels NanoPhotometer (Implen GmbH, München) quantifiziert und anschließend in eine BP-Reaktion mit pDONR221 (isoliert aus DB3.1) und BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen™/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Alle vom Hersteller angegebenen Volumina pro BP-Reaktionsansatz wurden halbiert und die Reaktion wurde ÜN durchgeführt. Nach Termination der Reaktion mittels 0,5 µl Proteinase K und 10 min Inkubation bei 37 °C wurden 2,5 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation (2.2.14) in DH10β verwendet. Positive Klone wuchsen auf kanamycinhaltigem LB-Medium (5g/l Hefeextrakt, 10g/l Trypton, 5g/l NaCl) und wurden durch Kolonie-PCR (Siehe Schritt: 2.2.6), Restriktionsverdau (Siehe Schritt: 2.2.8) und Sequenzierung (Siehe Schritt: 2.2.16) bestätigt. Die LR-Reaktion mit pDest-Vektoren (isoliert aus DB3.1) zur Herstellung von Expressionsvektoren und Reportervektoren erfolgte mittels LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen™/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) unter Verwendung halber Volumina und

ÜN. Weitere Schritte erfolgten analog zur BP-Reaktion, wobei sich die Wahl des Antibiotikums nach dem Selektionsmarker des jeweiligen pDest-Vektors richtete.

2.2.13. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

2.2.13.1. *E. coli*

Bei der Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zellen und Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, ständig bei 4 °C oder in einem Eisbad gekühlt. 100 ml steriles LB-Medium wurde mit 1 ml einer frischen LB-Übernachtskultur (37 °C, 180 rpm) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C und 180 rpm in einem Erlenmeyerkolben angezogen. Die in 50 ml-Aliquots aufgeteilte Zellkultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und dann für 10 min bei 4000 g zentrifugiert (Eppendorf, Ausschwingrotor). Jedes Pellet wurde in 10 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und anschließend für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets jeweils in 2 ml 100 mM CaCl₂ mit 15 % [v/v] Glycerin resuspendiert. Die Suspensionen wurden für mindestens 30 min auf Eis gelagert und anschließend zu 100 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung lagerten die kompetenten Zellen bei -80 °C.

2.2.13.2. *A. tumefaciens*

Bei der Präparation chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. 200 ml YEB-Medium (Pepton 4 g; Saccharose 2 g; Hefeextrakt 40 mg; MgSO₄ 197 mg; H₂O zu 400 ml) wurden mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur (30 °C, 180 rpm) inokuliert und ÜN bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 erreicht wurde. Zellen wurden anschließend bei 8000 g für 10 min bei RT pelletiert (Eppendorf, Ausschwingrotor). Das Bakterienpellet wurde in 300 ml 1xTE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert, und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 20 ml YEB mit 15 % [v/v] Glycerin resuspendiert und in 200 µl Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung lagerten die kompetenten Zellen bei -80 °C.

2.2.14. Transformation von Bakterien

2.2.14.1. *E. coli*

Pro Transformationsreaktion wurden 100 µl kompetente *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut. Für Plasmid-Retransformationen wurden 10 ng DNA hinzugegeben. Bei Transformationen im Zuge einer klassischen Klonierung wurden 10 µl einer 20 µl-Ligationsreaktion hinzupipettiert, und bei Gatewayklonierungen waren es 2,5 µl eines 5 µl-Ansatzes. Der Bakterien-DNA-Ansatz wurde für 30 min auf Eis gelagert und schließlich bei 42 °C für 30 sec erhitzt. Nach einer Abkühlungsphase von 2 min auf Eis wurden zum Transformationsansatz 500 µl LB-

Medium hinzupipettiert. Zellen inkubierten für 1 h bei 37 °C und wurden für 4 min bei 4000 rpm (Tischzentrifuge, RT) pelletiert und in einem Restvolumen resuspendiert. Anschließend wurden sie auf LB-haltigen Agarplatten (1,5 % [w/v] Agar) steril ausgestrichen. Den Platten wurde vor deren Aushärtung ein Antibiotikum zur Selektion positiver Klone steril beigemischt. Kolonien wuchsen ÜN bei 37 °C.

2.2.14.2. *A. tumefaciens*

200 µl chemisch kompetente Agrobakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Plasmid-DNA (100-300 ng/µl) gemischt. Das DNA-Bakteriengemisch wurde für 5 min auf Eis gelagert und anschließend für 5 min in flüssigen Stickstoff eingefroren. Der Transformationsansatz wurde daraufhin für 5 min bei 37 °C inkubiert, bevor 1 ml SOC-Medium (Hefeextrakt 5 g; Trypton 20 g; NaCl 0,584 g; KCl 0,186 g; MgSO₄ 2,4 g; Glukose 3,6 g; H₂O zu 1000 ml) zugegeben wurde. Nach 3 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen für 4 min bei 4000 rpm (Tischzentrifuge, RT) abzentrifugiert, in einem kleinen Restvolumen resuspendiert und auf Agar- und Antibiotikumhaltigen YEB Platten (1,5 % [w/v] Agar) steril ausgestrichen. Die Antibiotikazusammensetzung für Agrobakterien bestand aus Rifampicin, Gentamycin und einem weiteren Antibiotikum, für welches ein Resistenzmarkergen auf dem transformierten Ti-Plasmid kodiert war. Kolonien wuchsen für 2-3 d bei 30 °C.

2.2.15. Mini- und Midi- Isolation von Plasmid DNA aus *E.coli*

Zur Plasmidisolation aus *E.coli* Zellen im kleinen Maßstab (ng/µl) wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Für Isolationen im µg/µl – Maßstab wurde das Nucleobond®PC 500 Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) benutzt, wobei stets das Midiprep-Protokoll für *Low-Copy* Plasmide angewandt wurde.

2.2.16. Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten durch die Firmen LGC Genomics (Berlin) oder GATC (Konstanz) unter Verwendung vorpipettierter Primer.

2.2.17. SDS PAGE, Westernblot und Immunodetektion

Zum Nachweis von transient exprimierten Proteinen mit HA-Markierung wurden etwa 10⁵ Mesophyllprotoplasten in 30 µl 3xHarnstoffpuffer (5 ml β-Mercaptoethanol, 50 ml 10 % Natriumlaurylsulfat (SDS), 19 ml 87 % Glycerin, 24 g Harnstoff, auf 100 ml mit H₂O, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) homogenisiert und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Diskontinuierliche SDS-Gele bestanden aus Trenngel (2 ml Acrylamid/Methylenbisacrylamid (30% [w/v] / 0,8% [w/v]), 1,5 ml 1,5 M Tris/HCL (pH 8,8), 2,4 ml H₂O, 60 µl 10% [w/v] SDS, 30 µl 11% [w/v] Ammoniumpersulfat, 10 µl TEMED) und Sammelgel (0,6 ml Acrylamid/Methylenbisacrylamid (30% / 0,8%), 1,5 ml 0,5 M Tris/HCL (pH 6,8), 3,8 ml H₂O,

60 µl 10% [w/v] SDS, 30 µl 11% [w/v] Ammoniumpersulfat, 10 µl TEMED). Pro Probe wurden 25 µl in jede Tasche appliziert. Zur Abschätzung von Molekulargewichten wurde stets der Proteinmarker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) aufpipettiert. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte mit einem Bio-Rad System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) unter Verwendung eines Laufpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% [w/v] SDS, pH 8,3) bei einer Netzspannung von 150 V und nicht limitierender Stromstärke, bis die Laufront aus dem Gel diffundierte (etwa 1 h). Vor dem Transfer auf eine Roti®-Fluoro PVDF-Membran (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) wurde diese für 5 min in 100%igem Methanol equilibriert. Der Transfer vom SDS-Gel auf die Membran erfolgte mit einem System der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) nach Herstellerangaben „nass“ in einem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% [v/v] Methanol) für 1 h bei 350 mA und 100 V. Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 x 10 min in 1xTBS-T-Puffer (für 10x: 12,11 g Tris, 88 g NaCl, 10 ml Tween-20, auf 1l mit H₂O, pH 7,5) gewaschen und anschließend ÜN in Blockierlösung (10 % [w/v] Magermilchpulver in 1x TBS-T) schüttelnd bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde anschließend für 3x5 min in 1 x TBS-T gewaschen und für 1 h mit murinem, monoklonalem HA-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1:3000 in Blockierlösung) behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift für 3x5 min in 1 x TBS-T wurde für 1 h mit Anti-Maus-Meerrettichperoxidase (HRP)-Antikörper (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) (1:10000 in Blockierlösung) behandelt. Die Membran wurde erneut für 3x5 min gewaschen, mit Roti®-Lumin (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) nach Herstellerangaben behandelt. Lumineszenz wurde mittels CCD-Kamera in einem Schwachlicht-*Imaging*-System (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) bei einer Belichtungszeit von 5 min detektiert. Zur Visualisierung der RuBisCO als Ladungskontrolle wurde die Membran anschließend mit Ponceau-Rot (0,1 % [w/v] Ponceau S in 5 % [v/v] Essigsäure) gefärbt und fotografisch dokumentiert.

2.3. Plasmide

Für Klonierungen wurde stets Col-0 gDNA als Template für Promotoren, und cDNA als Template für kodierende Sequenzen verwendet. Bei Verfügbarkeit von sequenzierten Klonen wurden diese als Templates bevorzugt. Besondere Templates werden unter 2.3.1-2.3.3 erwähnt. Alle Ligationsprodukte und Entryvektoren, sowie ausgewählte LR-Produkte wurden sequenziert. Vektorenbezeichnungen und die zur Klonierung verwendeten Primer können Tabelle A 4 und Tabelle A 5 entnommen werden.

2.3.1. Binäre Plasmide zur stabilen Pflanzentransformation

Zur Herstellung von 35S:HF-*group* VII-ERF Konstrukten wurden LR-Reaktionen mit pEN-ERF72, pEN-ERF74 und pEN-ERF75 (Wehner et al., 2011) in Kombination mit p35S:HF-

GATA (Mustroph et al., 2010) durchgeführt (von Angelika Mustroph). Für *GFP*-Reporter-Vektoren wurden zunächst Promotorabschnitte mittels spezifischen Primern amplifiziert und per BP-Reaktion in pDONR221 integriert. LR Reaktionen wurden mit pGATA:HF-GFP-RPL18 (Mustroph et al., 2009) durchgeführt. Vektoren zur Herstellung stabiler LUC-Reporterlinien waren Derivate des Gateway-Vektors pBGWL7 (Karimi et al., 2005). Für pBGWL7_3x33bpmin:LUC wurde zunächst die 3x33bpmin-Kassette aus p3x33bpmin:LUC (siehe 2.3.2) isoliert und per BP-Reaktion in pDONR221 eingebracht.

2.3.2. Plasmide zur transienten Protoplastentransformation

Wenn nicht anders erwähnt, stammten alle im Protoplastentransaktivierungsassay (PTA) verwendeten Effektorstrukturen sowie die Entryvektoren pEN-ERF72, pEN-ERF74 und pEN-ERF75 von Wolfgang-Dröge Laser (Wehner et al., 2011). Der *Renilla* *Luziferase*-kodierende Vektor p70SRUC wurde in Stahl et al., (2004) beschrieben. Die kodierenden Sequenzen von *LBD41*, *ZFP1* und einer trunkeierten Version *ZFP1ΔEAR* sowie von *RAP2.3* wurden über BP- und LR-Reaktion in den Gatewayvektor pHBTL-HA-GW (Wehner et al., 2011) eingebracht. Die *GFP*-kodierende Sequenz zur Herstellung von p35S:HA-GFP stammte aus einem pENTRY-Vektor, welcher von Natalia Hess zur Verfügung gestellt wurde. Zur Herstellung von pHBTL-GW:HA:VP16 wurde die Sequenz der VP16-Domäne aus pER10 (Zuo et al., 2000) isoliert und mittels PacI-Restriktionsschnittstellen in pHBTL-GW:HA integriert. Der Entryvektor pEN-LBD41“B“ von Willi Riber diente zur Herstellung von pHBTL-LBD41ΔEAR:HA:VP16. Der Vektor p35S:BD-RAP2.2 war ein Derivat von p35S:GBD-GW (Ehlert et al., 2006) und wurde mit pEN-ERF75 (Wehner et al., 2011) per LR-Reaktion hergestellt. Der Gatewayvektor p35S-rfA-HBD, welcher zur C-terminalen Fusion eines Glukokortikoidrezeptors diente, wurde von Monika Tomar zur Verfügung gestellt. Das Insert (MA)RAP2.2 wurde mittels spezifischen Primern hergestellt, welche einen N-terminalen Basenaustausch und eine c-terminale Deletion des Stopcodons hervorriefen.

Stromaufwärts gelegene Sequenzen der Gene *LBD41*, *PDC1*, *PCO1*, *AT5G44730* und *At5g20790* wurden ab dem ATG per PCR isoliert und mit BamHI- und NcoI-Schnittstellen in pBT10GAL4UAS, unter Entfernung der GAL4UAS Bindestelle, integriert. Der *MGD3*-Promotor wurde auf die gleiche Weise, aber mittels EcoRI- und NcoI-Schnittstellen kloniert. Punktmutationen wurden per *de novo*-Synthese des Reportervektors pLBD41prom5'-2_a:LUC unter Verwendung von *mismatch*-Primern eingeführt (siehe 2.2.6.2). Vor der Transformation in *E.coli* wurde der methylierte Templatevektor mittels DpnI-Behandlung zerstört. Zur Herstellung des pmin:LUC wurden 52 bp des 35S-Promotors aus pGATA:HF-GFP-RPL18 (Mustroph et al., 2009) mit spezifischen Primern isoliert und per BamHI- und NcoI-Restriktionsschnittstellen in pBT10GAL4UAS ligiert. *LBD41*-Promotoren mit 3'-Deletionen wurden mit BamHI-Schnittstellen in pmin:LUC ligiert. Synthetische Promotoren

mit repetitiven Sequenzen wurden als einzelsträngige Oligonukleotide durch (Invitrogen™/Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) synthetisiert, wie in 2.2.7 präpariert und per BamHI-Schnittstellen in pmin:LUC integriert.

2.3.3. Plasmide für das Hefe-1-Hybrid System

Alle Hefektoren zur Klonierung (pMW#2, pMW#3, pMW#5, pDEST-AD) und Kontrollvektoren (PromB0507.1-HIS, PromB0507.1-LAC, AD-CES-1) wurden von A. J. M. Walhout (Deplancke et al., 2006; Reece-Hoyes et al., 2009) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung von Aktivator-domäne (AD):TF-Fusionen wurden Entryvektoren mit kodierenden Sequenzen von HRE1, HRE2, RAP2.2, CKC/ANT und RAP2.12 (Wehner et al., 2011) und RAP2.3 per LR Reaktion in den Vektor pDEST-AD rekombiniert. Doppelseitige, BamHI-verdaute Promotorconcatemere wurden in den Gateway-Donorvektor pMW#5 ligiert und per LR-Reaktion in pMW#2 und pMW#3 rekombiniert.

2.4. Protoplastentransformation und Luziferasemessung

2.4.1. Protoplastenisolation aus dem Blattmesophyll von *A. thaliana*

Sämtliche Lösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt und bei RT verwendet. Für einen 10 ml-Protoplastieransatz wurden 60 junge Rosettenblätter mit sichtbaren Trichomen von 3-4 Wochen alten Pflanzen an der Blattbasis abgeschnitten. Blätter wurden in 1 mm-dünne Streifen geschnitten und mit Protoplastierlösung (500 mg Zellulase; 150 mg Macerozym (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Haarlem, NL); 26,6 ml 0,75 M Mannitol; 2 ml 0,5 M KCl; 2 ml 0,5 M MES (pH 5,7); 0,5 ml 1 M CaCl₂; H₂O zu 50 ml) in einem Becherglas überschichtet. Ein Vakuum (10 mm Hg) wurde angelegt, bis Gasblasen aus dem Blattgewebe austraten, und über 4 h aufrechterhalten. Nach langsamer Wiederbelüftung wurde die Protoplastensuspension für 5 min bei 300 rpm geschüttelt. Isolierte Protoplasten wurden von Geweberesten, durch einen Dekantierungsschritt durch ein 63 µm-Stahlnetz, getrennt. Intakte Protoplasten wurden pelletiert (Ausschwing rotor, 120 g, 2 min, RT, Beschleunigung Stufe 3, Bremse Stufe 2) und in W5-Lösung (4,5 g NaCl; 9,1 g CaCl₂; 5 ml 0,5 M KCl; 2 ml 0,5 M MES (pH 5,7); H₂O zu 500 ml) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, wobei die Zentrifugation hier 1 min dauerte. Nach erneutem Pelletieren der Protoplasten wurden sie in MMg-Lösung (26,6 ml 0,75 M Mannitol; 1,5 ml 0,5 M MgCl₂; 0,4 ml 0,5 M MES (pH 5,7); H₂O zu 50 ml) resuspendiert und bis zur Transformation für maximal 1 h bei RT gelagert. Die finale Protoplastenkonzentration betrug 4x10⁴ Zellen/ml. Für Experimente mit hohem Durchsatz wurde die Protoplastenisolation wie in Wehner et al., (2011) durchgeführt.

2.4.2. Transiente Protoplastentransformation und Pharmakonbehandlung

Für Experimente mit geringem Durchsatz

Für Transaktivierungsassays wurden Protoplasten mit 2 µg mindestens eines Effektoronstruktes, 4 µg eines Reporteronstrukts, und 0,5 µg des Normalisierungsvektors p70SRUC (Stahl et al., 2004) co-transformiert. Wenn das Experiment auf eine anschließende Transkriptanalyse oder einen Westernblot abzielte, wurden 20 µg eines Effektoronstruktes eingesetzt. Die Protoplastenmenge und sämtliche Volumina zur Transformation wurden in diesem Fall verdoppelt. Ein DNA-Volumen von 20 µl wurde nie überschritten. Zur transienten Protoplastentransformation wurde Plasmid-DNA in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Durch 6-maliges Invertieren wurde die DNA mit 200 µl der Protoplastensuspension vermischt. Zum Protoplasten-DNA-Gemisch wurden 220 µl PEG-Lösung (20 g PEG₄₀₀₀; 14,16 ml H₂O; 13,3 ml 0,75 M Mannitol; 5 ml 1 M CaCl₂) zugefügt und 15 mal invertiert. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Transformationsreaktion durch Zugabe von 800 µl W5-Lösung gestoppt. Protoplasten wurden pelletiert (Festwinkelrotor, 120 g, 1 min, RT, Beschleunigung Stufe 4, Bremse Stufe 4) und in 300 µl WI-Lösung (33,3 ml 0,75 M Mannitol; 2 ml 0,5 M KCl; 0,4 ml 0,5 M MES (pH 5.7); H₂O zu 50 ml) resuspendiert. Transformierte Protoplasten wurden ÜN unter Langtagbedingungen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug für Transaktivierungsexperimente 18 h und für Westernblots oder Transkriptanalysen ohne weitere Behandlung 22 h. Für die Behandlung der Protoplasten mit Dexamethason (DEX) und Cycloheximid (CHX) wurde nach 18 h Inkubation im Langtag zunächst mit 100 µM CHX oder 0,16 % [v/v] des Lösungsmittels DMSO vorbehandelt. Nach 30 min Inkubation unter Langtagbedingungen wurden entweder 1 µM DEX hinzugegeben oder 0.83 % [v/v] des Lösungsmittels Ethanol und dann für weitere 4 h unter Langtagbedingungen inkubiert. Zur Ernte wurden Zellen vom Überstand befreit und entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis Gebrauch gelagert oder direkt für die quantitative LUC-Messung weiterverarbeitet.

2.4.2.1. Für Experimente mit hohem Durchsatz

Das Screening nach *LBD41*-regulierenden TFs im PTA wurde in Würzburg, am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie im Labor von Professor Wolfgang Dröge-Laser, verwirklicht. Transformationen wurden im Maßstab einer 96-Well Mikrotiterplatte, mit einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Well, durchgeführt. Plasmid-DNA des Reporteronstruktes und je einem Effektoronstrukt wurde zu je 1 µg in jedes Well vorgelegt. Zur Kontrolle wurden auch Ansätze mit Wasser statt Plasmid, mit Reporterkonstrukt und nicht kodierendem Auffüllvektor 35S:ΔGFP (Wehner et al., 2011) und einem konstitutiv aktiven 35S:LUC-Konstrukt (Wehner et al., 2011) präpariert. Die DNA wurde mit 30 µl Protoplastensuspension durch 6-maliges Pipettieren mit einer Multikanalpipette und „wide

mouth“ Pipettenspitzen vermischt. Zum Ansatz wurden 33 µl PEG-Lösung pipettiert und durch 10-maliges Pipettieren gemischt. Nach 20 min Inkubationszeit bei RT wurde die Transformationsreaktion durch die Zugabe von 120 µl W5-Lösung und 5x Pipettieren gestoppt. Protoplasten wurden pelletiert (Hettich Rotina 420R, Ausschwingrotor 4723; 100 g; 30 sec) und in 100 µl WI-Lösung resuspendiert. Die Inkubation erfolgte ÜN (12 h) unter Langtagbedingungen. Bei Wiederholungsexperimenten zur Bestätigung positiver Kandidaten wurde 1 µg des p70SRUC-Vektor (Stahl et al., 2004) zur Normalisierung der Transformationseffizienz co-transformiert. Darüber hinaus wurden hier 3 biologische Replikate pro Effektor durchgeführt.

2.4.3. Quantitative Luziferasemessung

2.4.3.1. Für Experimente mit geringem Durchsatz

Die Messung der Luziferaseaktivitäten der Firefly-Luziferase (fLUC) erfolgte mit dem Beetle Juice BIG KIT (PJK, Kleinbittersdorf), die der Renilla Luziferase (rLUC) mit dem Renilla-Juice BIG KIT (PJK, Kleinbittersdorf). Zunächst wurde der WI-Überstand abgenommen und durch 1x Lysis-Juice2 (4°C) ersetzt. Die Zellyse wurde durch wiederholtes Pipettieren unterstützt, und Zellysate wurden bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. 20 µl des Lysats wurde mit 100 µl der jeweiligen Substratlösung in einem transparenten Polystyrolröhrchen gemischt und sofort in einem Lumac Biocounter M2010 (Lumac Systems, Titusville, Florida USA) bei einer Integrationszeit von 10 sec gemessen. Das Verhältnis zwischen den LUC Aktivitäten (fLUC/rLUC) wurde für jede Probe berechnet. Induktionswerte ergaben sich aus fLUC/rLUC-Werten der verglichenen Proben, bezogen auf die der Basalaktivitätskontrolle, welche HA:GFP als Effektorersatz enthielt.

2.4.3.2. Für Experimente mit hohem Durchsatz

Zur Messung der Luziferaseaktivität bei fLUC transformierten Protoplasten im PTA-Screening wurden die Zellen pelletiert (Hettich Rotina 420R, Ausschwingrotor 4723; 100 g; 30 sec) und in 40 µl 1 mM D-Luziferin (D-Luziferin Kaliumsalz (Synchem UG & Co. KG, Felsberg / Altenburg) in WI) aufgenommen. Dies erfolgte durch das automatische Pipettiersystem des Robion Solaris *plate reader luminometer* (STRATEC Biomedical AG, Birkenfeld). Die Messung der fLUC-Aktivität erfolgte in lebenden Protoplasten sequenziell mit einer jeweiligen Integrationszeit von 15 sec.

Für Wiederholungsexperimente mit Normalisierung der Transformationseffizienz wurden Protoplasten vor der Messung mit 50 µl 1 x Lysis-Juice2 (PJK, Kleinbittersdorf) durch 5 x Pipettieren lysiert. Platten wurden nach 15 min Inkubation auf Eis bei 1000 g für 5 min zentrifugiert, und 10 µl des Lysats wurde zur Messung der LUC-Aktivitäten mit 50 µl Substratlösung gemischt. Die fLUC-Aktivitätsmessung erfolgte mittels des Beetle Juice BIG KITs (PJK, Kleinbittersdorf), und die der rLUC mit dem Renilla-Juice BIG KIT (PJK,

Kleinbittersdorf). Messungen wurden mit dem Robion Solaris *plate reader luminometer* (STRATEC Biomedical AG, Birkenfeld) durchgeführt.

2.5. Stabile Pflanzentransformation

Eine 500 ml Agrobakterien-Kultur in YEB-Medium wurde ÜN bei 180 rpm und 30 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 5500 g für 20 min wurde eine OD₆₀₀ von 0,8 mit 5 % [w/v] Saccharoselösung + 0.02 % [v/v] Silwet L-77 eingestellt. Die Suspension wurde in Messbecher gefüllt, und oberirdische Organe von blühenden *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für 10 sec unter leichtem Schwenken eingetaucht. Pflanzen wurden in Plastikfolie eingehüllt und horizontal ÜN in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden Pflanzen bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen kultiviert. Reife Samen wurden frühestens 5 d nach der Ernte flüssig oberflächensterilisiert (Inkubation für 3 min in 70 % Ethanol, 3 min in 50 % [v/v] Natriumhypochlorit + 0,1 % [v/v] Triton x100, 3 x 3 min in H₂O), für 3 d stratifiziert und auf antibiotikumhaltigen MS-Medium aufgebracht. Die Selektion positiver Transformanten der T1-Generation erfolgte nach 7 d Wachstum unter Langtagbedingungen.

2.6. Kreuzung von *Arabidopsis thaliana* Genotypen

Zur Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden von geschlossenen Blüten der Pollen-Empfängerpflanzen alle Sepalen, Tepalen und Stamen entfernt. Stamina mit reifen Antheren wurden aus offenen Blüten von Pollen-Donorpflanzen isoliert und auf das Stigma von Karpellen der Empfängerpflanzen aufgetragen. Bestäubte Blüten wurden markiert, und Samen wurden nach Reifung unter Langtagbedingungen geerntet.

2.7. Hypoxiebehandlung und Überflutung

Für Experimente zur Messung der Genexpression nach Hypoxie wurden Pflanzen oder Blattabschnitte in ein Überdrucksystem mit konstantem Durchfluss von 100 % Stickstoffgas gebracht und bei Belichtung unter Langtagbedingungen inkubiert. 7 d-alte Keimlinge wurden dabei vertikal in offenen, MS-Medium enthaltenden Platten inkubiert. Petiole der Blattabschnitte von 3-Wochen-alten Pflanzen auf Erde wurden in wassergefüllte Eppendorf-Reaktionsgefäße gesteckt, um Turgeszenz während der Hypoxiebehandlung zu gewährleisten. 20 Tage-alte, intakte Pflanzen befanden sich während der Behandlung in frisch gewässerten Erdtöpfen. Kontrollpflanzen wurden während der Behandlung stets unter ambienten Langtagbedingungen gehalten. Für Transkriptanalysen wurde eine Behandlungszeit von 2 h gewählt. Für Experimente zum Nachweis hypoxieinduzierter Translationsprodukte wurde die Inkubationszeit auf 9 h erhöht. Nach Hypoxiebehandlung wurde das Pflanzenmaterial entweder sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt oder zur qualitativen LUC Messung sofort untersucht.

Um das Überleben von *A. thaliana*-Keimlingen unter Hypoxiebedingungen zu quantifizieren, wurden 5 d-alte Keimlinge, gewachsen auf MS-haltigem Medium (siehe Schritt: 2.1.1), für 10 h in Dunkelheit in einem 100 % Stickstoff-Überdrucksystem begast. Nach Wiederbelüftung regenerierten die Keimlinge für 5 d unter Langtagbedingungen. Die Auswertung von insgesamt 19 Replikaten mit je 15 Keimlingen erfolgte durch die Festlegung eines „Survival Scores“ wie in Gibbs et al., (2011).

Um die Überlebensrate unter Überflutungsbedingungen zu messen, wurden 3 Wochen-alte Pflanzen, gewachsen unter Kurztagsbedingungen, für 3 d in temperaturangepasstem Wasser in Dunkelheit überflutet. Zur Replizierbarkeit wurde die Behandlung stets 3 h nach Beginn des Lichtzyklus begonnen. Vor Evaluation der Überlebensrate wurde eine Erholungsphase von 15 d unter Kurztagbedingungen bei ausreichender Bewässerung gewährleistet. Prozentuale Überlebensraten ergaben sich aus dem mittleren Verhältnis zwischen regenerierten und toten Pflanzen bei 3 biologischen Wiederholungen mit je 5 Individuen pro Genotyp. Die Anzahl an regenerierten Blättern, welche größer als 1 mm waren, wurde gezählt. Es wurde das Frischgewicht von lebendigem Sprossgewebe gemessen.

2.8. Qualitative Biolumineszenzmessung *in vivo*

Zur qualitativen Messung der LUC-Aktivität wurden Blattabschnitte oder intakte Pflanzen gleichmäßig mit 2 mM D-Luziferin (PJK, Kleinbittersdorf) + 0,1 % [v/v] Triton X 100 besprüht. Nach 2 min Inkubation in Dunkelheit wurde das Gewebe in einem Schwachlicht- *Imaging* System (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) bei einer Belichtungszeit von 10 min fotografiert.

2.9. Quantitative Realtime-PCR

Die Quantifizierung von cDNA erfolgte im MyiQ® Single-Color Real-Time PCR Detection System der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Alle Pipettierschritte erfolgten unter Benutzung von Handschuhen auf Eis. Die cDNA, welche aus 1 µg RNA synthetisiert wurde (siehe 2.2.5), wurde 1:50 mit Wasser verdünnt und zu je 5 µl mit 5 µl Primermix (0,5 µM fw + 0,5 µM rev) und 10 µl 2x iQ® SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) im Well einer iCycler iQ® PCR Plates 96-well Platte (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) gemischt, welche mit Microseal® ‚B‘ Film versiegelt wurde. Das Standardprogramm zur PCR-basierten Quantifizierung lautete 8 min bei 95°C und darauffolgenden 40 Zyklen mit 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 1 min. Zur Normalisierung der Expressionslevel diente das Referenzgen EF-1-α. Die Differenz aus Schwellenwerten (CT-Werte) der Zielgene und CT-Werten von EF-1-α wurde berechnet

(ΔCT). Relative Transkriptlevel waren $1000 \times 2^{-\Delta CT}$. Alle Primersequenzen sind in Tabelle A 5 aufgelistet.

2.10. Messung der ADH-Aktivität

7 d-alte Keimlinge wurden zu zwei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten auf MS-Medium unter Langtagbedingungen angezogen. Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und auf Eis in 300 μ l Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH, pH 6,8; 5 mM Mg-acetat; 15 % [w/v] Glycerin; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,1 mM Pefabloc (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 5 mM β -Mercaptoethanol) homogenisiert. Die Suspension wurde für 15 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert, bevor der klare Überstand gekühlt separiert wurde. Zur Messung wurden in einer Küvette 20 μ l Proteinextrakt, 960 μ l 50 mM TES-Puffer, pH 7,5 und 10 μ l 17 mM NADH gemischt und für 5 min inkubiert. Vor und nach Zugabe von 10 μ l 1 M Acetaldehyd wurde für 5 min spektralphotometrisch bei 340 nm (Specord®200 PLUS, Analytik Jena AG, Jena) gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford, wobei je 10 μ l des Proteinextraktes bzw. einer Bovine Serum Albumin (BSA) Standardlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz (Roti®Quant, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) gemischt und nach 5 min bei 595 nm gemessen wurde. Die Enzymaktivität wurde aus der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit, bezogen auf die Gesamtproteinmenge berechnet.

2.11. Hefe-1-Hybrid System

2.11.1. Transformation von Hefezellen

Der Hefestamm *Y1H-aS2* wurde einerseits zur Herstellung von stabilen Köderstämmen transformiert und zum anderen zur transienten Expression von AD-Beuteplasmiden in diesen Köderstämmen. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei RT durchgeführt. Die Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen erfolgte am Tag der Transformation. Dazu wurde zunächst eine Kolonie mit einer sterilen Impföse auf eine frische Platte mit 25 ml YAPD Medium (20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 0,16 g Adeninhemisulfat-dihydrat; 17,5 g Agar; 2 % [w/v] Glucose; H₂O zu 1000 ml) übertragen und ÜN bei 30 °C inkubiert. Das finale Volumen Q, welches sich aus der Anzahl der geplanten Transformationsansätze n und dem Einzelvolumen e eines Transformationsansatzes ergab, wurde berechnet. Für die Integration von linearisierten Ködervektoren betrug e = 200 μ l und bei der transienten Transformation von 40 ng Beuteplasmid betrug e = 30 μ l. Der frische Hefestamm wurde in einem Volumen von 200Q flüssigem YAPD Medium (20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 0,16 g Adeninhemisulfat-dihydrat; 2 % [w/v] Glucose; H₂O zu 1000 ml) zu einer OD₆₀₀ von 0,15-0,2 resuspendiert. Die Starterkultur wurde für etwa 5 h bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert und schließlich bei 700 g für 5 min zentrifugiert (Ausschwingrotor, RT). Die Zellen

wurden in 20Q H₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 4Q einer frischen TE/LiAc Lösung (5 ml 10 x TE-Puffer (100mM Tris, 10 mM EDTA; pH 8.0); 5 ml Lithiumacetat (1M); H₂O zu 50 ml) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einem Volumen von 1Q der TE/LiAc Lösung aufgenommen. Zur Suspension wurden Q/10 einzelsträngige Lachssperma DNA (10 mg/ ml) gemischt. Das Hefe/TE/LiAc/ssDNA - Gemisch wurde zu Aliquots mit je 1e aufgeteilt und mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt. Zu diesem Ansatz wurde ein Volumen von 5(e+Plasmid) einer frisch hergestellten TE/LiAc/PEG Lösung (5 ml TE (10 x pH 8,0); 5 ml Lithiumacetat (1M); 40 % [w/v] PEG₃₃₅₀; H₂O zu 50 ml) gegeben und gründlich vermischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min – 4h bei 30 °C inkubiert und schließlich für 20 min bei 42 °C hitzegeschockt. Zellen wurden sofort pelletiert (1 min, RT, 700 g) und in H₂O resuspendiert. Das finale Volumen zur Herstellung von stabilen Köderstämmen betrug 700 µl, jenes für die transiente Transformation von Beuteplasmiden zum Protein-DNA Interaktionsnachweis betrug 20 µl.

2.11.2. Herstellung von stabilen Köderstämmen

Zur Herstellung von Köderplasmiden wurden einzelsträngige Oligonukleotide nach Annealing in den Entryvektor pMW#5 ligiert und schließlich mittels LR-Reaktion in die Reportervektoren pMW#2 und pMW#3 eingebracht (siehe 2.2.11, 2.2.12 und 2.3.3). Für die Integration der Vektoren in den Hefestamm *Y1H-aS2* wurden zunächst separate Restriktionsreaktionen angesetzt. Für pMW#2-Konstrukte wurden 2 µg des Ködervektors, 2,5 µl Bovines Serum Albumin (BSA; 1 mg / ml), 2,5 µl des 10 x Restriktionspuffers R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 20 U XhoI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); und H₂O zu 25 µl verwendet. Bei Vektoren mit pMW#3-Rückgrat wurden 2 µg des Ködervektors, 2,5 µl Bovines Serum Albumin (BSA; 1 mg/ ml), 2,5 µl des 10 x Restriktionspuffers Tango (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 20 U NcoI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA); und H₂O zu 25 µl verwendet. Die Verdau-Reaktionen wurden für 3 h bei 37 °C inkubiert. 20 µl beider Reaktionsansätze wurden schließlich in einer Co-transformation in das *Y1H-aS2* Genom eingebracht (siehe 2.11.1). Der gesamte Transformationsansatz von 700 µl wurde auf 3 150 mm-Platten ausgestrichen, welche Sc-Ura-His Medium (1,7 g/l Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glukose, 0,8 g/l Dropout Mix, 1% [w/v] Agar, pH 5.6 (NaOH)) enthielten. Der Dropout Mix enthielt je 2 g Adeninhemisulfat, Arginin HCl, Isoleucin, Leucin, Lysin HCl, Methionin, Tyrosin, Serin, Threonin, je 3 g Phenylalanin und Tryptophan sowie 9 g Valin. Hefekolonien wuchsen daraufhin für 3-5 d bei 30 °C.

Zum Test auf Autoaktivierung wurden 24 Kolonien pro Transformationsansatz in 200 µl H₂O resuspendiert. 100 µl jeder Suspension wurde 1:10 mit H₂O verdünnt und zur Messung der

OD₆₀₀ genutzt. Nach Angleichung der finalen Volumina durch 1:100 Verdünnungen der Koloniesuspensionen wurden gleiche Hefekonzentrationen zu je 3,5 µl Tropfen auf Platten mit Sc-Ura-His aufgebracht und bei 30 °C für 5 d inkubiert. Zur Determinierung der experimentellen 3 Amino-1,2,4 triazol (3AT) Konzentration, bei welcher autoaktives Wachstum inhibiert wurde, wurden die positiven Klone ebenfalls auf Sc-Ura-His Platten mit 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM und 80 mM 3AT aufgetropft. Die niedrigste Konzentration an 3AT, welche zur Inhibition des 3x33:HIS Reporters ausreichte, betrug 40 mM. Zur Vergleichbarkeit zwischen den Köderstämmen wurde dieses Kriterium zur Selektion aller weiteren Stämme genutzt.

2.11.3. Protein-DNA Interaktionsnachweis

Zum Nachweis der Bindung von TFs an Promotorabschnitte wurden jeweils 2 µl (20 ng/µl) eines Beutevektors ungeschnitten in die zuvor hergestellten Köderstämmen transfiziert (siehe 2.11.1). Das Volumen eines Transformationsansatzes betrug 20 µl. Zum Vergleich der Bindungskapazitäten wurden alle Transformationsansätze auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt und schließlich zu 3,5 µl Einheiten auf Platten mit Sc-Ura-His-Trp+40mM3AT Medium aufgetropft. Um subtile Unterschiede im Hefewachstum zu erkennen, wurden zusätzlich Verdünnungen zwischen 1:10¹ und 1:10³ hergestellt und aufgetragen. Nach 5 d Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Transformationsansätze photographisch dokumentiert. Zur Kontrolle des Transformationserfolges wurde eine Wasserkontrolle eingeschlossen. Die Gleichheit der Transformationseffizienz wurde anhand des Hefewachstums bei niedrigen Verdünnungen auf Sc-Ura-His-Trp Medium ohne 3AT Zusatz abgeschätzt. Um eine aktivierende Eigenschaft der AD Domäne auszuschließen, wurde der „leere“ AD-exprimierende pDEST-AD Vektor transformiert. Bindungsabhängige Transaktivierungseigenschaften von AD-Fusionen wurden bei niedrigen Hefeverdünnungen auf Sc-Ura-His-Trp+ 40 mM 3AT durch Vergleich des Hefewachstums evaluiert. Der Dropout-Mix zur Herstellung dieses Mediums enthielt kein Tryptophan.

2.11.4. β-Galactosidase Assay

Hefekolonien, welche die höchste initiale Hefekonzentration aufwiesen und für 5 d auf SC-Ura-His-Trp-3AT Medium wuchsen, wurden für das β-Galactosidase-Kolonie-Filter-Lift-Assay benutzt. Dazu wurden Hefezellen von Platten auf eine Nitrozellulosemembran (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) übertragen und für 10 sec in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Membran mit der Hefeseite nach oben auf eine weitere Membran platziert, welche zuvor mit Z-Puffer/X-gal Lösung (X-gal Lösung (1,67 ml): 2mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid in *N,N*-Dimethylformamid; Z-Puffer (100ml): 16 g/l Na₂HPO₄*7H₂O, 5,5 g/l NaH₂PO₄H₂O, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l MgSO₄*7H₂O, pH 7; β-

Mercaptoethanol (0,27 ml)) getränkt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und dauerte bis zur aussagekräftigen Blaufärbung der Hefelysate, jedoch nicht länger als 4 h.

2.12. Phylogenetisches *shadowing*

Für das detaillierte phylogenetische shadowing des *LBD41*- und des *PDC1*-Promotors wurden zunächst mithilfe der Phytozome-Datenbank (Goodstein et al., 2012) homologe Gene innerhalb der Pflanzenfamilie *Brassicaceae* gesucht. Bei orthologen Genen aus *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata* wurden 1500 bp stromaufwärts, relativ zur Transkriptionsstartseite (TSS), und der 5' untranslatierte Bereich (5' UTR) isoliert. Beim *LBD41*-orthologen Gen aus *Capsella rubella* war keine 5' UTR annotiert, weshalb eine 1500 bp-Sequenz, stromaufwärts vom ATG, isoliert wurde. Paarweise *Alignments* wurden mit mVISTA (Frazer et al., 2004) unter Benutzung des Alignmentprogrammes Shuffle-LAGAN (Brudno et al., 2003) durchgeführt. Die Ergebnisse des Sequenzalignments wurden mittels eines multiplen Alignmentprogrammes CHAOS und DIALIGN geprüft (Brudno et al., 2004).

2.13. Vergleichendes phylogenetisches *Footprinting*

Für vergleichende phylogenetische Promotoranalysen wurden 49 global hypoxieinduzierte Gene ausgewählt (Mustroph et al., 2009). Um einen positiven Kontrolldatensatz zu generieren, wurden 49 Gene ausgewählt, welche bei Phosphatmangel im Spross im Vergleich zum Wildtyp am stärksten induziert waren (Bustos et al., 2010). Die zugrundeliegenden Microarraydaten wurden wie in Mustroph et al., (2010) beschrieben, analysiert.

Putativ orthologe Gene wurden aus einer öffentlich verfügbaren Datei („best-BLAST hits“) der Datenbank PLAZA (Proost et al., 2009) ausgewählt. Die PLAZA *workbench* Funktion wurde genutzt, um stromaufwärts-gelegene, 1 kb lange Bereiche, relativ zur annotierten TSS, zu isolieren. Daraufhin wurden pro co-regulierter Gengruppe 49 Sätze an orthologen Promotorsequenzen jeweils mittels MEME (Bailey und Elkan, 1994) einer Motivvorhersage unterzogen. Die folgenden Parameter wurden verwendet: Motivverteilung: Null oder eine pro Sequenz; Anzahl verschiedener Motive: 3; Mindestanzahl (Sequenzen pro Motiv): 2; Maximalanzahl (Sequenzen pro Motiv): 200; Minimale Motivilänge: 6; Maximale Motivilänge: 14. In Fällen, bei denen die maximal erlaubte Anzahl von 60000 Buchstaben überschritten wurde, wurde ein kleinerer Satz an orthologen Genen mithilfe des integrativen *orthology viewer* in PLAZA (Proost et al., 2009) isoliert. Der anschließende Vergleich der 147 vorhergesagten Motive wurde mit STAMP (Mahony und Benos, 2007), bei unveränderten Parametereinstellungen, durchgeführt. Der entstandene Baum, welcher im Newick Format ausgegeben wurde, wurde mit MEGA dargestellt (Tamura et al., 2011). Ein Motivcluster wurde als eine Gruppe von mindestens 5 Motiven definiert, welche zum gemeinsamen

Knoten eine Kantenlänge von kleiner als 0.01 aufwiesen, was eine starke Ähnlichkeit impliziert. Es wurde daher angenommen, dass es sich bei Motiven innerhalb eines Clusters um Ausprägungen einer einzigen Konsensussequenz handelte. Motive eines Clusters wurden mittels STAMP in „*position specific scoring matrices*“ (PSSMs) umgewandelt. Diese wurden, ebenfalls mit STAMP, genutzt, um in drei Datenbanken AthaMap, AGRIS und PLACE (Higo et al., 1999; Davuluri et al., 2003; Steffens et al., 2004) nach Ähnlichkeiten zu bereits bekannten CREs zu suchen. Übereinstimmungen mit statistischen E-Werten kleiner als $1e^{-05}$ wurden als signifikant betrachtet. Für die Erstellung von Sequenzlogos mittels WebLogo3 (Crooks et al., 2004) wurden TRANSFAC formatierte PSSMs verwendet.

2.14. Überrepräsentationsanalysen

PSSMs von jedem Cluster wurden in tab-formatierte Matrices umgewandelt und in das RSA-tool „*matrix-scan*“ eingegeben (Turatsinze et al., 2008). Stromaufwärts gelegene Intergensequenzen von allen 27416 Protein-kodierenden Genen von *Arabidopsis thaliana* wurden nach Anzahl und Position der vorhergesagten Clustermotive untersucht. Ein *sig*-Wert von mindesten 4,5 galt dabei als einziges Kriterium für eine ausreichende Übereinstimmung. Um eine Anreicherung der vorhergesagten Clustermotive in Promotoren von 49 *core* hypoxieresponsiven Genen, im Vergleich zum Gesamtgenom zu prüfen, wurde die Bonferroni-korrigierte hypergeometrische Verteilung berechnet ($p < 10^{-4}$). Diese Methode wurde ebenso angewandt, um eine statistisch signifikante Überrepräsentation in 100 bp-langen Promotorsegmenten, im Vergleich zur Gesamtlänge von 3000 bp zu finden. Zur Berechnung von p-Werten zur Anreicherung von Clustermotiv-tragenden *core*-Genen (Mustroph et al., 2009) in veröffentlichten Expressionsdatensätzen (van Dongen et al., 2009; Gibbs et al., 2011) wurde die Anzahl von 49 *core* Genen als Populationsgröße bei der hypergeometrischen Analyse gewählt.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation von hypoxieresponsiven Promotoren

Um die hypoxieinduzierte differenzielle Genregulation auf Promotorebene untersuchen zu können, wurde zunächst geklärt, ob für die Aktivierung eines Gens unter Sauerstoffmangel dessen vorangeschaltete Intergensequenz ausreichte. Zu diesem Zweck wurden stromaufwärts gelegene Sequenzen 5' der kodierenden Sequenz (CDS) dreier *Arabidopsis* Hypoxiemarkergene *LBD41* (*LBD41prom5'-1* und 2), *PDC1* (*PDC1prom5'-1* und 4) und *At4g10270* (*At4g10270prom5'-1* und 2) isoliert und vor ein *GFP* Reportergen kloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden stabil in das *Arabidopsis*-Genom des Col-0 Ökotyps eingebracht. Um eine Sauerstoffmangelantwort messen zu können, wurden 7 d-alte Keimlinge für 2 h unter einer 100 %-igen Stickstoffatmosphäre bei Belichtung unter Langtagbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR auf Expressionsunterschiede von hypoxieresponsiven Genen untersucht (Abbildung 2). Da es sich um eine qualitative Nachweismethode handelte, wurden bereits Selektionsmarker-positive Keimlinge von segregierenden T2-Populationen untersucht. Im Vergleich zu Keimlingen, welche unter natürlichen Sauerstoffbedingungen verblieben, zeigten hypoxiebehandelte Individuen eine deutliche Akkumulation des *LBD41*-Transkriptes (Abbildung 2). Da *LBD41* zu den 49 Hypoxie *core* Genen zählt, welche in *Arabidopsis thaliana* unabhängig vom Gewebstyp transkriptionell unter Sauerstoffmangel akkumulieren (Mustroph et al., 2009), deutete dieses Ergebnis auf adäquate Sauerstoffmangelbedingungen im experimentellen Aufbau hin. In drei unabhängigen Linien mit dem Reporterkonstrukt *LBD41prom5'-1* akkumulierte auch das Transkript des Reportergens *GFP*, was zeigte, dass die dem *LBD41*-Gen vorangeschaltete Sequenz von 2049 bp Länge ausreichte, um dessen Hypoxieantwort zu erklären (Abbildung 2a). Die gleiche Beobachtung konnte auch für eine von zwei Reporterlinien mit der 2245 bp-langen Sequenz *PDC1prom5'-1* (Abbildung 2b), und bei zwei Reporterlinien mit der 1304 bp-langen Sequenz *At4g10270prom5'-1* (Abbildung 2c) gemacht werden. Keine differenzielle Genexpression zeigten hingegen das hypoxieunabhängige Referenzgen *Tubulin* (*TUB*) und der Selektionsmarker *NPTII*, welcher in der Nähe der Reporterkonstrukte lokalisiert war (Abbildung 2). Dies sollte demonstrieren, dass die transkriptionelle Aktivierung von *GFP* eine spezifische Hypoxieantwort war und zudem nicht durch einen möglichen insertionsbedingten Positionseffekt beeinflusst wurde. Da die untersuchten 5'-gelegenen Nukleotidsequenzen die regulierte Expression eines Gens ermöglichten, erfüllten sie die Definition eines Promotors (Christen und Jaussi, 2004).

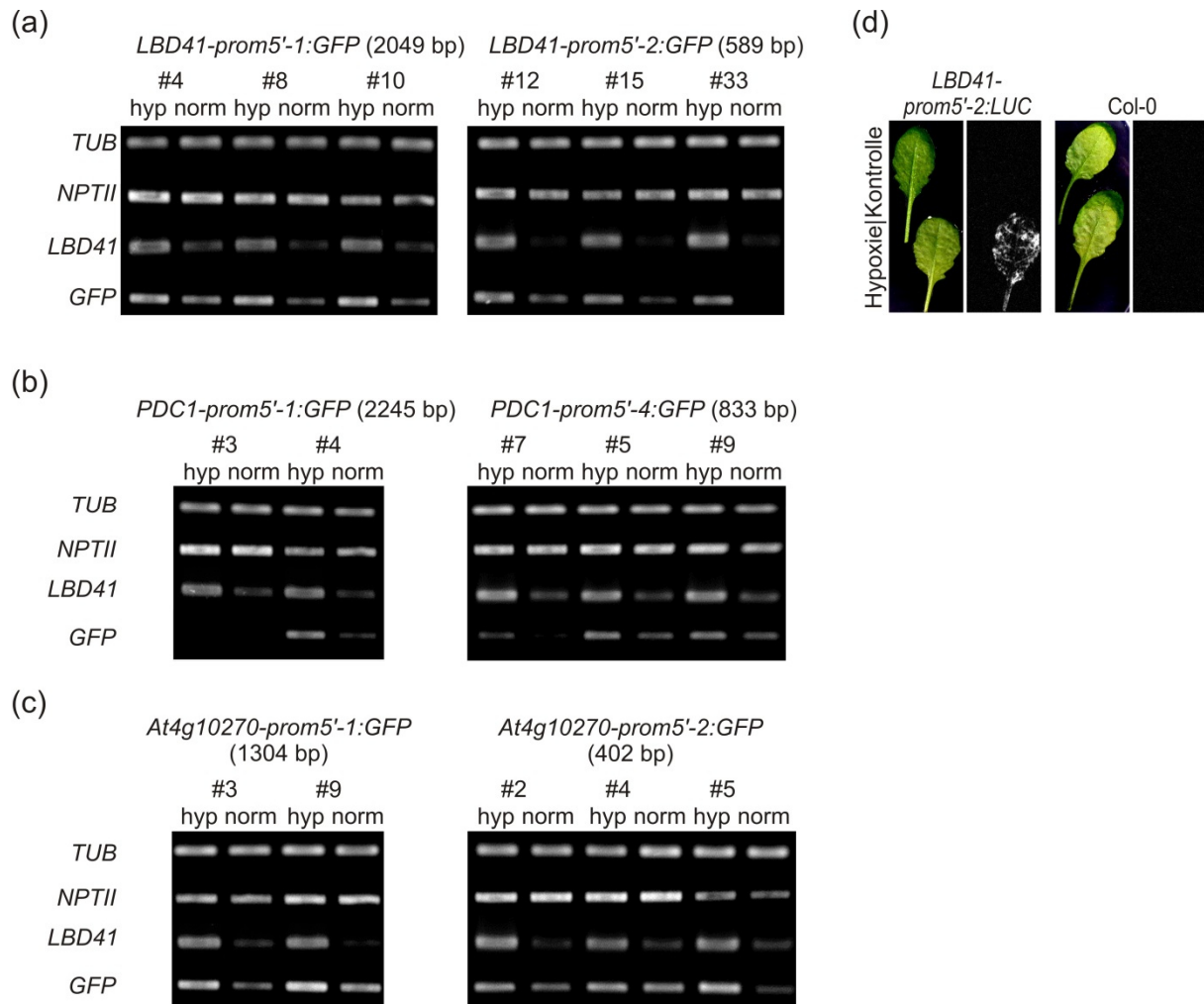


Abbildung 2: Promotoren von *A. thaliana* Hypoxiemarkergenen sind unter Sauerstoffmangel induziert (a-c) Repräsentative Ergebnisse semiquantitativer RT-PCR-Analysen mit 7 d-alten Keimlingen von stabilen unabhängigen (#n) *Promotor:GFP*-Reporterlinien unter Kontrollbedingungen (norm) oder 2 h Hypoxie (hyp). Alle Promotoren sind vom ATG stromaufwärts gelegene Sequenzen mit variabler Länge am 5' Ende. Hypoxiemarkergen *LBD41* diente zur Kontrolle adäquater Hypoxiebedingungen. Referenzgene *Tubulin* (*TUB*) und *NPTII* dienen zur Kontrolle gleicher cDNA-Qualität und Quantität. **(d)** D-Luziferin-behandelte Blattabschnitte einer 3-Wochen-alten stabilen *Promotor:Luziferase*-Reporterlinie mit dem 589 bp-langen *LBD41prom5'-2* und Col-0 unter Kontrollbedingungen oder nach 9 h Hypoxie.

Um den funktionellen Teil der Promotoren weiter einzuengen, wurde dieses Experiment mit *GFP*-Konstrukten wiederholt, welche vom 5'-Ende verkürzte Promotorsequenzen enthielten (Abbildung 2). Bei der verkürzten Version des *LBD41*-Promotors von 589 bp Länge (*LBD41prom5'-2*) zeigte sich eine deutliche Akkumulation des *GFP*-Transkriptes, welche, wie die des *LBD41*-Transkriptes, streng hypoxieabhängig verlief (Abbildung 2a). Auch die Hypoxieantwort verkürzter Versionen der anderen Promotoren *PDC1prom5'-4* (833 bp) und *At4g10270prom5'-2* (402 bp) wurden in je drei unabhängigen Reporterlinien getestet

(Abbildung 2b und c). In allen Linien erschien ein stärkeres Signal des *GFP*-Transkriptes unter hypoxischen Bedingungen als unter atmosphärischem O₂-Partialdruck.

Um dieses Ergebnis mit einem zweiten Reportergen, der *Firefly-Luziferase* (*fLUC*) zu bestätigen, wurde eine homozygote *LBD41prom5'-2:fLUC* Reporterlinie generiert. Nachdem 3 Wochen alte Rosettenblätter für 9 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden, zeigte sich bei Applikation des Substrates D-Luziferin ebenfalls eine deutlich erhöhte Reportergen-Aktivität (Abbildung 2d). Das fLUC-Signal wurde weder in Col-0 unter beiden Bedingungen, noch in der Reporterlinie unter normaler Atmosphäre detektiert, was einen Nebeneffekt als Ursache des Signals ausschloss. Es gibt Hinweise, dass *LBD41* unter der Kontrolle des NERP steht (Licausi et al., 2011b). Wenn *LBD41prom5'-2* für diese Funktion ausreicht, sollte es im *prt6*-Hintergrund eine höhere Basalaktivität besitzen als in Col-0. Tatsächlich konnte in einem transienten Protoplastensystem eine signifikante Aktivitätssteigerung eines *LBD41prom5'-2:fLUC* Konstruktes in *prt6* gegenüber Col-0 gemessen werden (Abbildung 3). Daraus wurde geschlossen, dass die Sauerstoffmangelreaktion des kurzen Promotorfragmentes auf der direkten oder indirekten Interaktion mit NERP-Substraten beruhte. Aus den Daten konnte geschlossen werden, dass sich alle Informationen, welche für die stressbedingte Aktivierung von *LBD41*, *PDC1* und *At4g10270* ausreichend waren, sich jeweils innerhalb von 589 bp, 833 bp und 402 bp stromaufwärts vom jeweiligen Startcodon befanden.

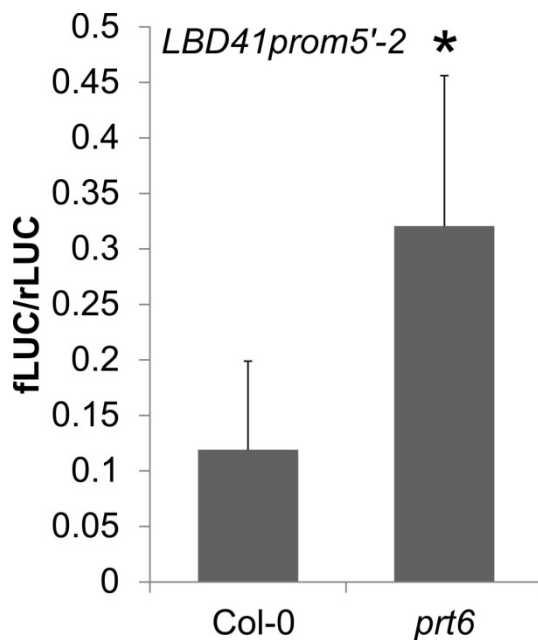


Abbildung 3: Der hypoxieresponsive Promotor *LBD41prom5'-2* ist ein Ziel des *N-end Rule Pathways* Basalaktivität des 589 bp-langen *LBD41prom5'-2* im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps und *prt6*. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 6 Replikaten. * zeigt einen signifikanten Unterschied zur Col-0-induzierten Promotoraktivität von $p < 0.05$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly- Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase des Kontrollplasmids.

3.2. Protoplastenbasiertes Screening nach Transregulatoren eines hypoxieresponsiven Promotors

Die Tatsache, dass eine Vielzahl an Genen unter Sauerstoffmangel in *Arabidopsis thaliana* durch NERP-Substrate aktiviert wird (Gibbs et al., 2011), war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Die Suche nach weiteren Transregulatoren ist dennoch sinnvoll, denn gibt es Hinweise, dass das transregulatorische Netzwerk unter Hypoxiestress sehr komplex ist und nicht allein durch die aktivierende Wirkung von *group VII*-ERFs erklärt werden kann. Diese Vermutungen stützen sich vor allem auf das Vorhandensein transkriptioneller Aktivatoren und Repressoren unter den Zielgenen von *group VII*-ERFs (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Zudem wurde die Anreicherung von translatierten mRNA-Molekülen, darunter auch TF-Genen, unter Sauerstoffmangel beobachtet, welche unter Kontrollbedingungen nicht durch einen gestörten NERP aktiviert werden (Gibbs et al., 2011). Darüber hinaus befindet sich eine Vielzahl von überrepräsentierten, potenziellen CREs in den Promotoren hypoxieresponsiver Gene, was eine Regulation durch mehrere TFs impliziert (Klok et al., 2002; Liu et al., 2005; Mohanty et al., 2005; Licausi et al., 2011c). Um weitere Transregulatoren zu identifizieren, wurde mithilfe eines Reporterkonstruktes ein Screening gegen eine TF-Expressionsdatenbank

durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine stromaufwärts gelegene Sequenz von *LBD41* mit einer Länge von 1649 bp vom Startcodon (*LBD41prom5'-1a*) in den fLUC-Reportervektor pBT10GAL4UAS, unter Austausch der *GAL4UAS* Sequenz, kloniert. Da eine kürzere Version dieses *LBD41*-Promotors hypoxieresponsiv war (Abbildung 2a), wurde angenommen, dass auch *LBD41prom5'-1a* CREs zur Hypoxieregulation besaß. Effektorstrukturen bestanden aus N- oder C-terminalen HA-fusionen (Ehlert et al., 2006) an etwa 1350 kodierenden Sequenzen (CDS). Unter diesen befanden sich beschriebene oder vorhergesagte TFs aus 38 Transkriptionsfaktorfamilien von *Arabidopsis thaliana* (Wehner et al., 2011). Die Expression der Konstrukte *in planta* wurde durch einen konstitutiv aktiven CaMV 35S Promotor gewährleistet. Alle Effektoren befanden sich in einer geordneten Expressionsbibliothek und wurden zusammen mit dem *LBD41prom5'-1a:LUC* Konstrukt in Mesophyllprotoplasten des Col-0 Ökotyps von *Arabidopsis thaliana* co-transformiert. Zur Bestimmung der Basalaktivität wurde das nicht kodierende Konstrukt *35S:ΔGFP* statt eines Effektors transformiert. Das Screening basierte auf einer unreplizierten und nicht normalisierten Messung von Luziferaseaktivitäten im 96-Well-Mikrotiterplattenmaßstab. Transformationsansätze, welche eine mindestens 1,5-fach höhere Aktivität als die Basalaktivität aufwiesen, beinhalteten potenzielle Aktivatoren.

Insgesamt wurden 42 positiv regulatorische Kandidaten identifiziert, welche 14 Transkriptionsfaktorfamilien repräsentierten. Die am stärksten vertretene Familie war die AP2-EREBP-Familie, innerhalb welcher der *group* VII-ERF RAP2.2 das höchste Induktionslevel von 12 erreichte. Potenzielle Repressoren wurden in Ansätzen mit einem Induktionswert von weniger als 0,7 erwartet. Es wurden insgesamt 17 potenzielle Repressoren gefunden, welche Vertreter aus 6 Transkriptionsfaktorfamilien darstellten. Der Kandidat mit den stärksten Repressoreigenschaften war ERF5.

Um falsch-positive TFs auszuschließen, wurden alle Kandidaten in drei biologischen Replikaten und bei normalisierter Transformationseffizienz erneut auf transregulatorische Eigenschaften getestet (Abbildung 4; Abbildung 5). Zur Normalisierung der Transformationseffizienz wurde das Plasmid p70SRUC co-transformiert, welches für eine konstitutiv exprimierte Renilla Luziferase (rLUC) mit eigener Substratspezifität kodierte. Promotoraktivitäten wurden daher als vergleichbare Quotienten fLUC/rLUC dargestellt. Von 42 potenziellen Aktivatoren wurden 13 gefunden, welche mindestens tendenzielle Transaktivierungseigenschaften besaßen (Abbildung 4). Von diesen zeigten drei Faktoren einen signifikanten Unterschied zur Basalaktivität. Unter letzteren besaß RAP2.2 erneut die stärkste trans-Aktivität (114-fach), gefolgt von RAP2.12 und RAP2.3 (46-fach bzw. 18-fach) (Abbildung 4). Dieses Ergebnis machte deutlich, dass RAP2.2 gegenüber RAP2.12, mindestens für den getesteten Promotor, keine untergeordnete Rolle spielte. Die hohen und

signifikanten Transaktivierungskapazitäten von RAP2.2, RAP2.12 und RAP2.3 wurden von keinem anderen Kandidaten des Screenings erzielt, wodurch die Rolle von *group VII*-ERFs, als Hauptaktivatoren der primären Hypoxieantwort unwiderlegt blieb. Die restlichen *group VII*-ERFs, HRE1 und HRE2, erwiesen sich als relativ schwache, nicht signifikante Aktivatoren des *LBD41prom5'-1a* mit Induktionswerten von jeweils 8- und 6,5-fach (Abbildung 4). Der MADS-Box TF AGAMOUS-like 92 (AGL92) und der C2H2-TF INDETERMINATE(ID)-DOMAIN 5 (IDD5) erreichten Induktionswerte, die denen von HRE1 und HRE2 ähnlich waren (Abbildung 4). Beide Faktoren sind bisher nicht detailliert beschrieben worden und werden, im Gegensatz zu HRE1 und HRE2, unter Sauerstoffmangel nicht verstärkt transkribiert oder translatiert (Branco-Price et al., 2008). Darüber hinaus besitzen sie kein N-terminales MC-Motiv. Induktionswerte von möglicher biologischer Relevanz, aber ohne statistische Signifikanz (2-6-fach) wurden von den TFs At5g15480 (C2H2), PHERES1 (PHE1, MADS-Box), At1g49560 (G2-like), ABA INSENSITIVE 4 (ABI4, AP2-EREBP), AT1G64380 (AP2-EREBP) und GATA transcription factor 7 (GATA7, C2C2-GATA) in absteigender Reihenfolge erzielt (Abbildung 4).

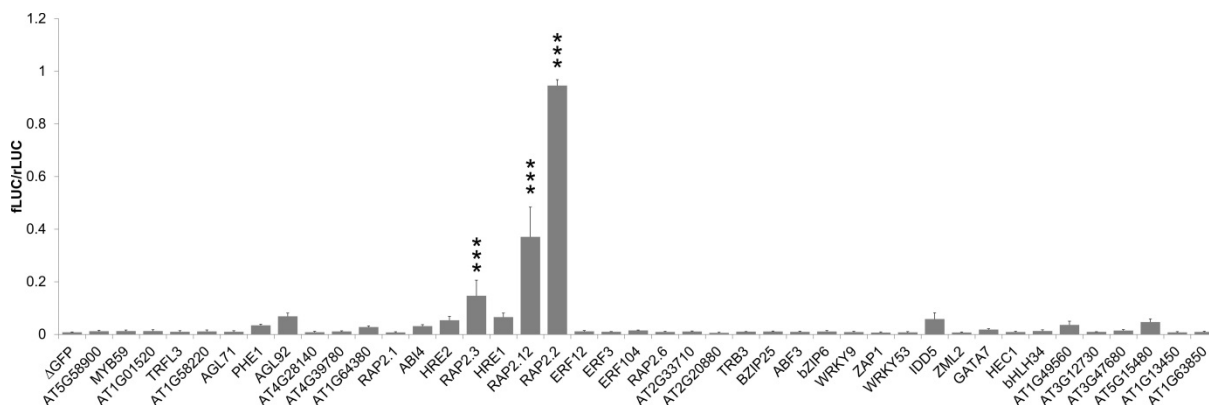


Abbildung 4: Protoplastenbasiertes Transkriptionsfaktorscreening bestätigt *Group VII*-ERFs als Hypoxie-Hauptaktivatoren Normalisierte Transaktivitätsmessung von 42 positiven Kandidaten aus etwa 1350 Transkriptionsfaktoren am 1649 pb-langen Promotor *LBD41prom5'-1a* im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Replikaten. *** zeigen signifikante Unterschiede zur nicht kodierenden Effektorkontrolle mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test, unteres Signifikanzlevel betrug $p < 0.05$). fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids.

Von ursprünglich 17 potenziellen Repressoren wurden für 11 mindestens tendenziell negativ regulatorische Eigenschaften bestätigt (Abbildung 5). Eine statistisch signifikante Abnahme, welche zwischen 18,5 % und 3 % der durch RAP2.2 erzielten Promotoraktivitäten lag, wurde bei 8 Faktoren gefunden (Abbildung 5). Die stärkste signifikante, repressorische Wirkung von

3,3 % Restaktivität besaß ZINC-FINGER PROTEIN 1 (ZFP1, C2H2), gefolgt von KANADI (KAN1, G2-like) mit 8,5 % und At1g63100 (GRAS) mit 9,6 %. Restaktivitäten zwischen 10 % und 18,5 %, welche ebenfalls statistisch signifikante Reduktionen der Promotoraktivitäten darstellten, wurden aufsteigend bei CONSTANS-like 2 (COL2, C2C2-CO-like), COL3 (C2C2-CO-like), B-BOX DOMAIN PROTEIN 14 (BBX14, C2C2-CO-like), BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) und At1g16640 (ABI3VP1) gemessen (Abbildung 5). Unter den nicht signifikanten, putativen Repressoren, welche die *LBD41prom5'-1a*-Aktivität auf 29 % - 43 % herabsetzen konnten, befanden sich CONSTANS (CO, C2C2-CO-like), GATA TRANSCRIPTION FACTOR 1 (GATA1, C2C2-GATA) und REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 (RRTF1, AP2-EREBP) (Abbildung 5). Die offensichtliche Überrepräsentation von CO-like Genen war auffällig. Da LBD41 ein stark hypoxieinduzierter TF ist (Mustroph et al., 2009) und zudem über Repressoreigenschaften verfügt (Kagale et al., 2010; Causier et al., 2012), wurde der TF, welcher in der Expressionsbibliothek fehlte, hier in die Untersuchung mit einbezogen. LBD41 erreichte ein Herabsetzen der eigenen Promotorsequenz *LBD41prom5'-1a* um etwa die Hälfte, was jedoch nicht statistisch signifikant war (Abbildung 5).

Die Eigenschaft, den *LBD41prom5'-1a* zu reprimieren, war ein erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung bei der Genregulation unter Hypoxiestress. Basierend auf Eigenschaften wie Repressionsstärke, der Besitz von Repressormotiven, repressionsrelevante Interaktionspartner, Hypoxieinduktion, Induktion bei Wiederbelüftung und Homologie zu anderen Kandidaten wurden potenzielle Repressoren ausgewählt und in unabhängigen Experimenten weiter untersucht. Die zentrale Fragestellung bezog sich dabei auf die physiologische Relevanz unter Hypoxiestress.

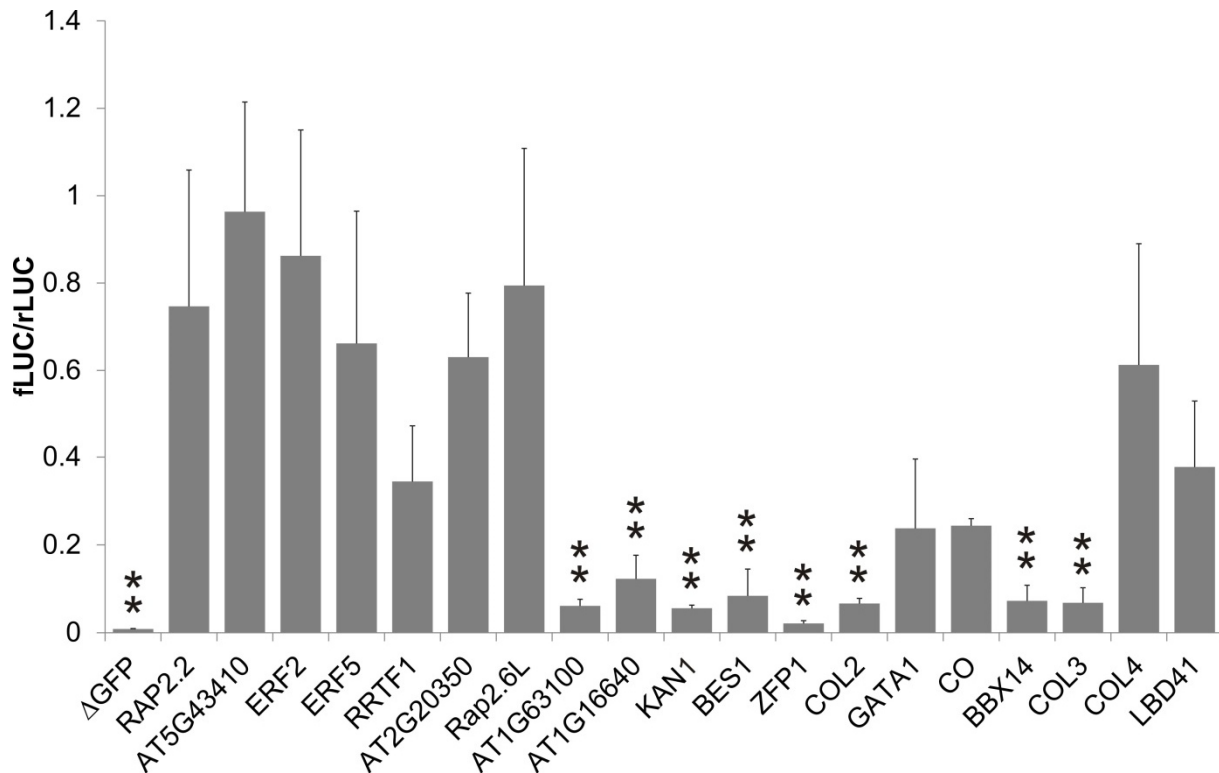


Abbildung 5: Bestätigung von potenziellen Repressoren eines hypoxieresponsiven Promotors

Normalisierte Transaktivitätsmessung von 18 Repressorkandidaten aus etwa 1350 Transkriptionsfaktoren und LBD41 am 1649 pb-langen Promotor *LBD41prom5'-1a* im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Potenzielle Repressoren wurden mit HA:RAP2.2 co-exprimiert. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Replikaten. ** zeigen signifikante Unterschiede zu HA:RAP2.2 mit $p < 0.01$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test, unteres Signifikanzlevel betrug $p < 0.05$). fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids.

3.3. Untersuchungen zu potenziellen Repressoren hypoxieresponsiver Gene

Das Überleben von *Arabidopsis thaliana* nach Überflutung basiert neben der Aktivierung von Genen auch auf deren adäquaten Herabregulation (Licausi et al., 2011b; Giuntoli et al., 2014). Eine rapide Abnahme von hypoxieresponsiven Transkripten kann nach Wiederbelüftung trotz der nuklearen Präsenz von RAP2.12 beobachtet werden (Kosmacz et al., 2014). Obwohl der TF HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR1 (HRA1) als ein mit RAP2.12 interagierender Repressor identifiziert wurde (Giuntoli et al., 2014), ist nicht auszuschließen, dass weitere Repressoren an der negativen Genregulation unter Hypoxie oder Wiederbelüftung beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die im Screening identifizierten, putativen Repressoren genauer untersucht.

3.3.1. Constans-like Transkriptionsfaktoren als redundante Repressoren der transkriptionellen Hypoxieantwort

COL-TFs besitzen Zink-Finger-Domänen und gehören in die Untergruppe der B-Box (BBX)-Proteine (Khanna et al., 2009). Innerhalb der BBX-Familie, welche in *Arabidopsis thaliana* 32 Mitglieder zählt (Chang et al., 2008; Kumagai et al., 2008; Khanna et al., 2009), grenzen sich die 16 COL-Gene dadurch ab, dass sie neben mindestens einer BBX-Domäne am N-Terminus auch eine CO, COL, TOC1- (CCT)-Domäne am C-Terminus aufweisen (Strayer et al., 2000; Ledger et al., 2001; Robson et al., 2001). COL-Proteine, welche zwei BBX-Domänen aufweisen, werden in die Strukturgruppen I und II unterteilt und jene, welche nur eine N-terminale BBX-Domäne besitzen, zählen zur Strukturgruppe III (Khanna et al., 2009). Im PTA-Screening wurden drei COL-Proteine der Strukturgruppe I (CO, COL2, COL3) und ein Mitglied der Strukturgruppe III (BBX14) als mögliche Repressoren des *LBD41prom5'-1a* identifiziert (Abbildung 5). Dies zeigte, dass der Besitz einer zweiten BBX-Domäne zur signifikanten Repression des Promotors nicht nötig war.

In der Proteinsequenz von BBX14 wurden zwei potenzielle *ERF-associated amphiphilic repression* (EAR) Repressormotive mit der Sequenz LxLxL gefunden (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009). Obwohl andere BBX-Proteine im nicht-normalisierten Screening zunächst keine offensichtliche regulatorische Wirkung hatten, besaßen auch die homologen Proteine (Khanna et al., 2009) BBX15 und COL7/BBX16 je ein EAR-Motiv (nicht gezeigt). Um Hinweise für eine Relevanz von COL-Proteinen bei der Repression hypoxieresponsiver Gene zu erhalten, wurden insgesamt 8 Vertreter aus den Strukturgruppen I und III auf repressorische Eigenschaften an weiteren hypoxieresponsiven Promotoren getestet. Eine Sequenzierung des COL4-kodierenden Plasmids ergab einen Fehler im offenen Leserahmen, was dessen Wirkungslosigkeit im Protoplastensystem erklärte (Abbildung 5). Alle weiteren bereits getesteten COL-TFs, sowie die Proteine COL5, BBX15, COL7/BBX16 und BBX 17 wurden in die Analyse einbezogen. Für alle Proteine, bis auf COL7/BBX16, konnten Repressoreigenschaften für den *LBD41prom5'-1a* bestätigt werden (Abbildung 6). Dies zeigte einerseits, dass weitere Vertreter der COL-Proteinfamilie potenzielle Repressoren waren und dass deren Repressoreigenschaften nicht mit dem Vorhandensein von EAR-Motiven korrelierten. Da der Promotor in dieser Analyse durch RAP2.12 statt durch RAP2.2 in einen aktivierten Zustand überführt wurde, kann geschlossen werden, dass die Repression nicht auf einer spezifischen Interaktion mit RAP2.2 beruhte (Abbildung 6). Eine verkürzte Promotorversion *LBD41prom5'-4*, welche im späteren Teil dieser Arbeit beschrieben wird, besaß am 5'-Ende eine essenzielle positiv regulatorische Sequenz für die Aktivierung durch RAP2.2 (Abbildung 21). Auch diese Promotorversion, wurde sie durch RAP2.12 aktiviert, konnte von den getesteten COL-Proteinen CO, COL2, BBX14 und COL7/BBX16 mindestens tendenziell reprimiert werden (Abbildung 6). Um auszuschließen,

dass die Repressoreigenschaften auf einer Protein-Protein Wechselwirkung zwischen COL-Proteinen und RAP2.2 oder RAP2.12 beruhte, wurde auch ein Concatemer der positiv regulatorischen Sequenz (*3x33bpmin*) allein getestet. Diese wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit als eine hypoxieresponsive, evolutionär konservierte, spezifische Bindestelle von RAP2.2 und RAP2.12 identifiziert (Abbildung 22; Abbildung 23; Abbildung 26). Der in diesem Experiment durch RAP2.2 aktivierte Promotor wurde durch die Anwesenheit von je einem Vertreter aus der Strukturgruppe I (COL2) und der Strukturgruppe III (BBX14) nicht negativ reguliert (Abbildung 6). Damit schien die repressorische Wirkung von mindestens diesen COL-Proteinen nicht auf einer Interaktion mit RAP2.2 zu beruhen, da diese unabhängig von der Promotorsequenz verlaufen würde. Im Vergleich dazu konnte ein weiterer hypoxieresponsiver Promotor, *PDC1prom5'-4* (Abbildung 2c), von den Faktoren CO, COL2 und BBX14 signifikant und von COL7/BBX16 tendenziell reprimiert werden (Abbildung 6). Die längere Promotorversion *PDC1prom5'-1* wurde zudem tendenziell von BBX14 reprimiert (Abbildung 6).

Da mehr als ein hypoxieresponsiver Promotor von COL-Proteinen negativ reguliert werden konnte, wurde eine Relevanz der COL-Gene für die transkriptionelle Regulation unter Sauerstoffmangel vermutet. Um auszuschließen, dass es sich dabei um generelle repressorische Effekte handelte, wurde zunächst ein NERP-unabhängiges Reportersystem mit cis- und trans-Komponenten der Phosphatmangelantwort etabliert, welches im späteren Verlauf dieser Arbeit näher beschrieben wird (Abbildung 18; Klecker et al., 2014). Der Promotor des phosphatmangelresponsiven Gens *At5g20790* (*At5g20790prom5'-1*) wurde durch den TF PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1) aktiviert (Abbildung 18; Klecker et al., 2014). Während die Anwesenheit von BBX14 zu einem nicht signifikanten Rückgang der Promotoraktivität führte, verursachten COL2 und COL3 keine Aktivitätsabnahme des *At5g20790prom5'-1* (Abbildung 6). Dies zeigte, dass die negativ regulatorischen Funktionen von COL2 und COL3 für hypoxieresponsive Promotoren im Protoplastensystem nicht auf einem experimentellen Artefakt beruhen.

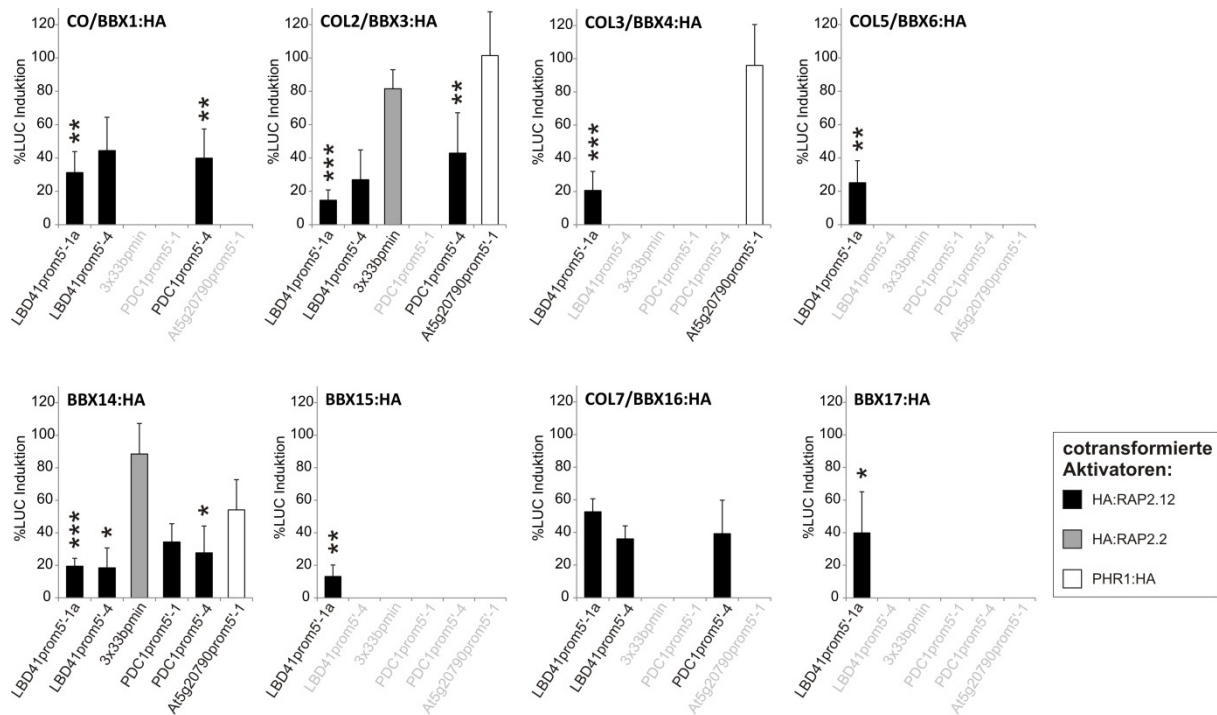


Abbildung 6: Constans-like Transkriptionsfaktoren sind spezifische Repressoren von hypoxieresponsiven Genen Normalisierte Transregulationsmessung von 8 Constans-like Transkriptionsfaktoren an Promotoren von Genen der Hypoxie core Antwort im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Zur Kontrolle der Hypoxiespezifität wurde der Promotor des Phosphatmangel-responsiven Gens At5g20790 benutzt. Hämagglutinin (HA)-markierte Constans-Like Proteine wurden mit Aktivatoren der Hypoxie- und Phosphatmangelantwort co-exprimiert (Legende). Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 6 Replikaten. * zeigen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Aktivatorkontrolle mit $p<0.05$, ** mit $p<0.01$ und *** mit $p<0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). % LUC Induktion ist der Aktivitätsanteil im Vergleich zur Induktionsänderung der Aktivatorkontrolle. Zur Berechnung von Induktionsänderung wurden fLUC/rLUC-Verhältnisse von Effektor-enthaltenden Proben durch fLUC/rLUC-Verhältnisse der Effektorkontrolle mit kodierendem *HA:GFP* geteilt. fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids.

Das PTA basierte auf der Interaktion von Translationsprodukten kodierender mit nicht kodierender extrachromosomaler DNA. Um zu prüfen, ob die transiente Überexpression von *COL3:HA* auch die Transkription genomischer DNA in Chromatinform reprimieren kann, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Im Vergleich zur Anwesenheit des Kontrolleffektors *HA:GFP* erzeugte *HA:RAP2.2* eine starke Aktivierung NERP-responsiver Gene, während das Referenzgen *TUB* und das nicht-NERP-responsive Hypoxiemarkergen *SIMILAR TO RCD ONE 5 (SRO5)* (Gibbs et al., 2011) keine Akkumulation zeigten (Abbildung 7). Die gleichzeitige Überexpression von *COL3:HA* führte zur deutlich geringeren Induktion von Transkripten der Gene *LBD41*, *At4g10270*, *At5g10040* und *PDC1* (Abbildung 7). Eine negativ regulatorische Funktion für das *ADH1*-Transkript konnte mit dieser Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ebenso wurden *TUB* sowie *SRO5* nicht negativ durch

COL3:HA beeinflusst, was dessen Spezifität für bestimmte Gene untermauerte (Abbildung 7). Ob COL-Proteine eine physiologische Relevanz unter Hypoxiestress besitzen, muss letztlich mittels *knock-out*-Analysen geklärt werden. Aufgrund der Größe der Genfamilie und der möglichen funktionellen Redundanz stellte dies für die hier repräsentierte Arbeit jedoch eine Schwierigkeit dar.

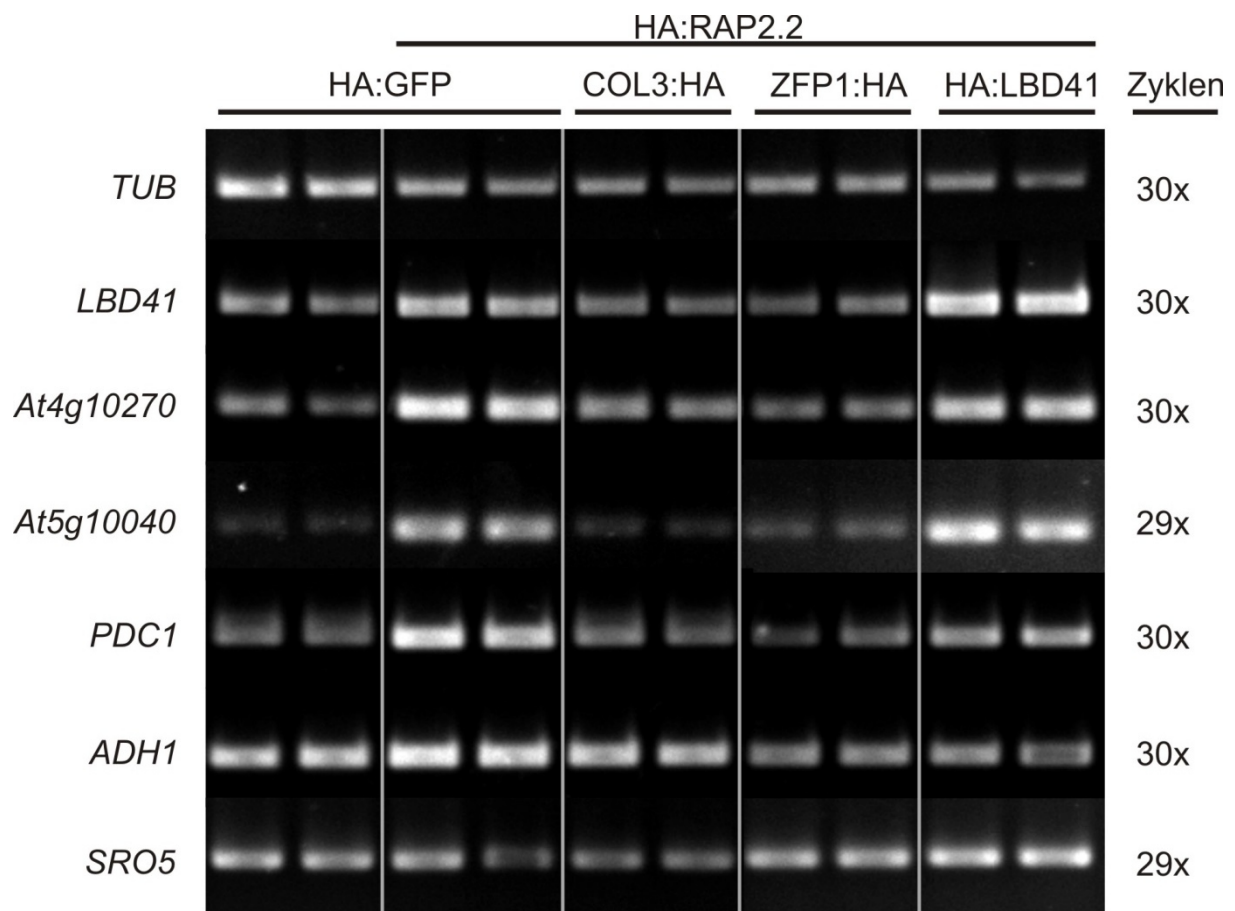


Abbildung 7: Potenzielle Repressoren vermindern die RAP2.2-induzierte Akkumulation nativer Hypoxiemarkergen-Transkripte Repräsentatives Ergebnis von zwei semiquantitativen RT-PCR-Analysen von transient transformierten Mesophyllprotoplasten des Col-0 Wildtyps. Transkriptmengen von hypoxieregulierten Genen wurde in Anwesenheit von Hämagglutinin (HA)-markierten potenziellen Repressoren und HA:RAP2.2 gemessen. Die basale Transkription wurde in Anwesenheit von HA:GFP kontrolliert. Zur Kontrolle des induzierten Zustandes wurden HA:GFP und HA:RAP2.2 co-exprimiert. Das Referenzgen *Tubulin* (*TUB*) diente zur Kontrolle der cDNA-Qualität und -Quantität.

3.3.2. RRTF1 besitzt keine essenzielle Funktion unter Hypoxie

Der TF REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 (RRTF1) gehört zur AP2-EREBP Familie und wird durch Methyljasmonat (Wang et al., 2008) und Lichtstress (Khandelwal et al., 2008) transkriptionell induziert. Transkriptomanalysen von hypoxiebehandelten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen ergaben außerdem, dass der TF auf

transkriptionaler und translationaler Ebene bereits nach 1 h Wiederbelüftung akkumuliert (Branco-Price et al., 2008). Da die Wiederbelüftung von Pflanzengewebe nach Hypoxie auch mit dem Rückgang von Transkripten einhergeht (Branco-Price et al., 2008), wurde die im PTA-Screening beobachtete, repressorische Eigenschaft von RRTF1 (Abbildung 5) näher untersucht.

Im transienten PTA-System wurden 5 Promotorversionen von den 3 Hypoxiemarkergenen *LBD41* (*LBD41prom5'-1a*; 2; *3x33bpmin*), *PDC1* (*PDC1prom5'-1*) und *At5g44730* (*At5g44730prom5'-1*) durch RAP2.12 oder RAP2.2 aktiviert (Abbildung 8a). Die co-Transformation von *HA:RRTF1* führte bei keinem Promotor zur signifikanten Aktivitätsreduktion im Vergleich zum aktivierten Zustand. Aufgrund des negativen Ergebnisses wurde die Expression von *HA:RRTF1* im PTA-System mittels Westernblot überprüft (Abbildung 8b). Sowohl *HA:RAP2.2* als auch *HA:RRTF1* waren auf Proteinebene bestimmbar, obwohl die per Proteinmarker abgeschätzten Molekulargewichte im SDS-Polyacrylamidgel bei beiden Faktoren etwa das Zweifache der vorhergesagten Gewichte (TAIR) betrug (Abbildung 8b). Abwesende Repressoreigenschaften von *HA:RRTF1* beruhten damit nicht auf der Abwesenheit des Faktors im Experiment.

Obwohl RRTF1 nicht als Repressor der Hypoxieantwort bestätigt werden konnte, implizierte dessen posthypoxische Induktion eine physiologische Aufgabe des TFs nach Sauerstoffmangel. Um dies untersuchen zu können, wurde eine T-DNA-Insertionslinie (SALK_150614) über NASC bezogen. Das T-DNA Insert befand sich im Exon des Gens im Col-0 Hintergrund (TAIR) und erzeugte ein *rrtf1*-Nullallel, wie mittels genspezifischen Primern auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde (Abbildung 8c). Während das Transkript von *RRTF1* im Col-0 Hintergrund nachgewiesen wurde, fehlte es in drei homozygoten Nachkommen der T-DNA-Insertionslinie. Die Intaktheit der cDNA wurde durch den Nachweis des Referenzgens *TUB* in allen Proben bestätigt (Abbildung 8c). Um zu testen, ob der Verlust von *RRTF1* einen Einfluss auf die Anfälligkeit von *Arabidopsis thaliana* gegenüber Sauerstoffmangel hat, wurde die Überlebensrate von Keimlingen gemessen. Dazu wurden 5 d-alte Keimlinge in Dunkelheit unter einer 100 % Stickstoffatmosphäre für 10 h begast und anschließend zur Regeneration unter aeroben Langtagbedingungen inkubiert. Die Überlebensrate von Col-0 betrug etwa 80 % (Abbildung 8d). Das Fehlen von *RRTF1* resultierte nicht in einer veränderten Überlebensfähigkeit gegenüber Col-0. Damit schien RRTF1 unter den durchgeführten experimentellen Bedingungen keinen essenziellen Einfluss auf die Hypoxieantwort genommen zu haben.

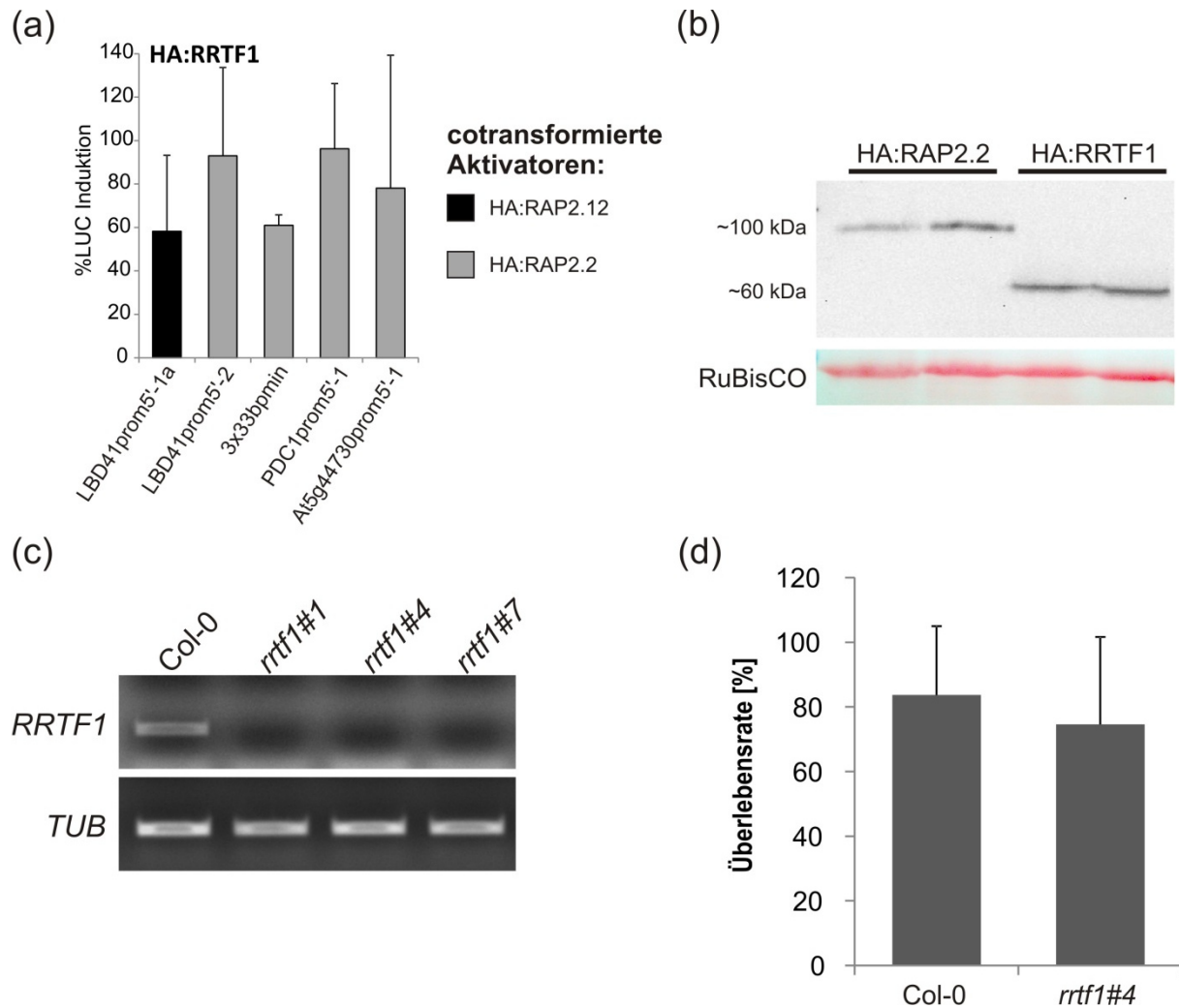


Abbildung 8: RRTF1 hat keinen Einfluss auf Genexpression und Überlebensfähigkeit von *Arabidopsis thaliana* bei Hypoxie (a) Normalisierte Transregulationsmessung von RRTF1 an Promotoren von Genen der Hypoxie-Kernantwort im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. RRTF1 wurde mit Aktivatoren der Hypoxieantwort co-exprimiert (Legende). Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 6 Replikaten. Im Vergleich zur jeweiligen Aktivatorkontrolle wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ nicht erreicht (einfaktorielle ANOVA). % LUC Induktion ist der Aktivitätsanteil im Vergleich zur Induktionsänderung der Aktivatorkontrolle (erklärt in Abbildung 6). (b) Westernblot zeigt Expression von Hämagglutinin (HA)-markierten RAP2.2- und RRTF1-Proteinen. Angaben zum Molekulargewicht wurden mittels Proteinmarker abgeschätzt. RuBisCO diente als Ladungskontrolle. (c) Genotypisierung einer Linie mit T-DNA-Insertion in *RRTF1* auf Transkriptebeine mittels semiquantitativer RT-PCR. Col-0 diente zur Kontrolle der Eignung verwendeter *RRTF1*-Primer und *Tubulin* (*TUB*) diente als Referenzgen zur Kontrolle von cDNA- Qualität und -Quantität. (d) Überlebensrate von 5 d alten Keimlingen des Col-0 Wildtyps und einer *rrtf1* knock out-Linie nach 10 h Hypoxie in Dunkelheit und anschließender Regeneration von 5 d unter Langtagbedingungen. Überlebensrate [%] zeigt Mittelwert von 19 Replikaten \pm Standardabweichung. Je Replikat wurde ein mittlerer „Survival Score“ für 15 Keimlinge ermittelt (Gibbs et al., 2011) und ins prozentuale Verhältnis zu einem Maximalwert von 5 gesetzt. Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Signifikanzniveau von $p < 0.05$; einfaktorielle ANOVA).

3.3.3. KANADI1 reprimiert einen funktionalen Promotorbereich von *LBD41*

KANADI1 (KAN1) ist ein Mitglied der GARP-Familie der MYB-like TFs und reguliert die abaxiale Identität von lateralen Organen (Kerstetter et al., 2001). Seine, im Vergleich zu RRTF1, starke Repressoreigenschaft im PTA-Screening stand im Einklang mit seiner zuvor beschriebenen Rolle als transkriptioneller Repressor (Wu et al., 2008; Huang et al., 2014).

Um einen weiteren Hinweis für eine mögliche Rolle bei der Repression hypoxieresponsiver Gene zu erhalten, wurden weitere PTA-Experimente durchgeführt. Der *LBD41prom5'-1a* wurde durch HA:RAP2.12 aktiviert (Abbildung 9). Die Anwesenheit von HA:KAN1 verursachte eine Repression der Promotoraktivität um 80 % (Abbildung 9), was auch beim RAP2.2-induzierten Zustand beobachtet wurde (Abbildung 5). Auch die im späteren Verlauf dieser Arbeit als RAP2.2/2.12-spezifische Promotorsequenz identifizierte 33bp-Region (Abbildung 26) konnte durch die Anwesenheit von KAN1 signifikant reprimiert werden (Abbildung 9). Da diese die Kernsequenz für die DNA-Bindung von KAN1 (GNATA(A/T)) (Huang et al., 2014) nicht enthielt (Abbildung 21), wurde vermutet, dass KAN1 auch über sequenzunabhängige Repressoreigenschaften verfügte. Diese Hypothese und die Relevanz von KAN1 bei Hypoxie sollte künftig getestet werden.

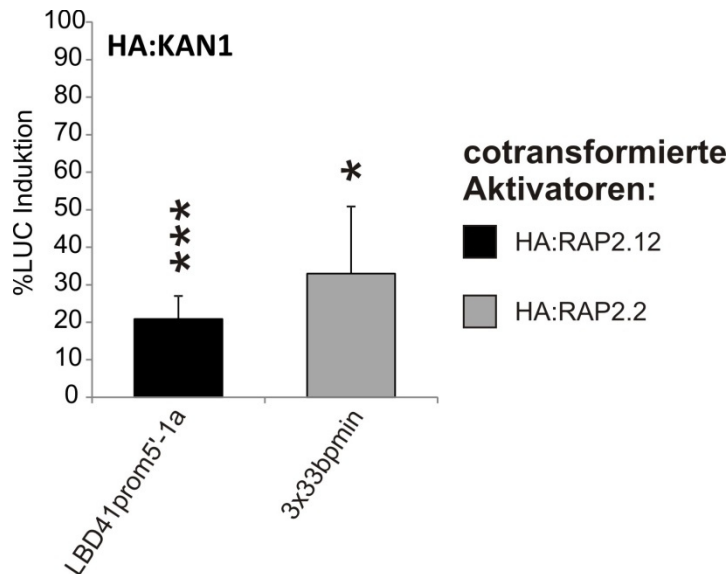


Abbildung 9: KANADI1 reprimiert die *group VII*-ERF Zielsequenz im LBD41-Promotor

Normalisierte Transregulationsmessung von Hämagglutinin (HA)-markiertem KAN1 an *LBD41*-Promotorversionen im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. KAN1 wurde mit Aktivatoren der Hypoxieantwort co-exprimiert (Legende). Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindesten 5 Replikaten. * zeigt signifikanten Unterschied zur Aktivatorkontrolle mit $p < 0.05$ und *** mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). % LUC Induktion ist der Aktivitätsanteil im Vergleich zur Induktionsänderung der Aktivatorkontrolle (erklärt in Abbildung 6).

3.3.4. ZFP1 ist ein starker Repressor hypoxieresponsiver Promotoren

ZINC FINGER PROTEIN 1 (ZFP1) gehört zur Familie der C2H2-Zinkfinger-Proteine (Englbrecht et al., 2004). In photomorphogenen Keimlingen wird es im Sprossapex, in sich entwickelnden Blättern und Gefäßen verstärkt exprimiert (Chrispeels et al., 2000) und besitzt wahrscheinlich entwicklungsbiologische Aufgaben (Takatsuji, 1999). In der Proteinsequenz von ZFP1 taucht am N- und C-Terminus je ein EAR-Motiv auf (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009; Kagale et al., 2010). Obwohl homologe TFs über Repressoreigenschaften und EAR-Motive verfügen (Sakamoto et al., 2004; Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009), wurde ZFP1 bisher noch nicht als Repressor charakterisiert.

Eine wiederholte Messung der transregulatorischen Eigenschaften von ZFP1 für den RAP2.2-aktivierten *LBD41prom5'-1a* bestätigte das Ergebnis des Screenings. Mit einer Aktivitätsreduktion des Promotors um 90 % besaß ZFP1:HA die stärkste Repressorkapazität von allen hier getesteten, potenziellen Repressoren (Abbildung 10). Diese starke Aktivitätsabnahme wurde ebenfalls für die kürzere Promotorversion *LBD41prom5'-2* und die 33bp-Region, welche eine RAP2.2/2.12 Bindestelle enthielt (Abbildung 23), beobachtet (Abbildung 10). Die Promotoraktivität eines anderen Hypoxiemarkergens (*AT5G44730*) wurde ebenfalls in Anwesenheit von ZFP1:HA um etwa 90 % reduziert. Im Gegensatz zu den

drei *LBD41*-Promotorversionen und *AT5G44730prom5'-1* wurde der *PDC1prom5'-1* nicht signifikant, jedoch tendenziell um 55 % durch ZFP1:HA reprimiert.

Wie COL3:HA wurde auch ZFP1:HA in Anwesenheit von HA:RAP2.2 transient in Mesophyllprotoplasten überexprimiert. Anschließend wurden native Transkripte von Hypoxiemarkergenen semiquantitativ analysiert (Abbildung 7). Die gleichbleibende Abundanz von *TUB* und dem hypoxieresponsiven nicht-NERP-Zielgen *SRO5* waren erste Hinweise darauf, dass ZFP1 über keine unspezifischen Repressoreigenschaften verfügte (Abbildung 7). Im Gegensatz zu diesen Genen waren alle getesteten NERP-responsiven Gene, darunter auch *PDC1*, durch ZFP1:HA deutlich in ihrer Induktion gehemmt (Abbildung 7).

Um die Spezifität von ZFP1 für Zielgene des NERP weiter zu untermauern, wurde dessen Wirkung auf Zielpromotoren der Phosphatmangelantwort getestet (Abbildung 10). Hierbei ergaben sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse, da der durch PHR1 aktivierte *MGD3prom5'-1* signifikant durch ZFP1:HA reprimiert wurde, während *At5g20790prom5'-1* durch die Anwesenheit des putativen Repressors nicht negativ beeinflusst wurde (Abbildung 10).

Es wurde vermutet, dass mindestens eine der zwei vorhergesagten EAR-Motive in der Proteinsequenz von ZFP1 für dessen Funktion als transkriptioneller Repressor verantwortlich war. Um die Relevanz des C-terminal gelegenen Motivs zu prüfen, wurden die letzten 6 Aminosäuren DLTLKL, welche identisch mit dem EAR Motiv waren, deletiert (HA:ZFP1ΔEAR). Diese Version war in der Lage, den *LBD41prom5'-2*, welcher durch HA:RAP2.2 in einen aktivierten Zustand überführt wurde, um 90 % zu reprimieren (Abbildung 10). Damit unterschied sich HA:ZFP1ΔEAR nicht funktionell von ZFP:HA, was zeigte, dass das C-terminal gelegene EAR-Motiv keine Relevanz für die Repressoreigenschaft von ZFP1 besaß. Das Ausschalten des zweiten EAR-Motivs scheint daher notwendig zu sein, ist aber technisch schwieriger und sollte in anschließenden Projekten durchgeführt werden.

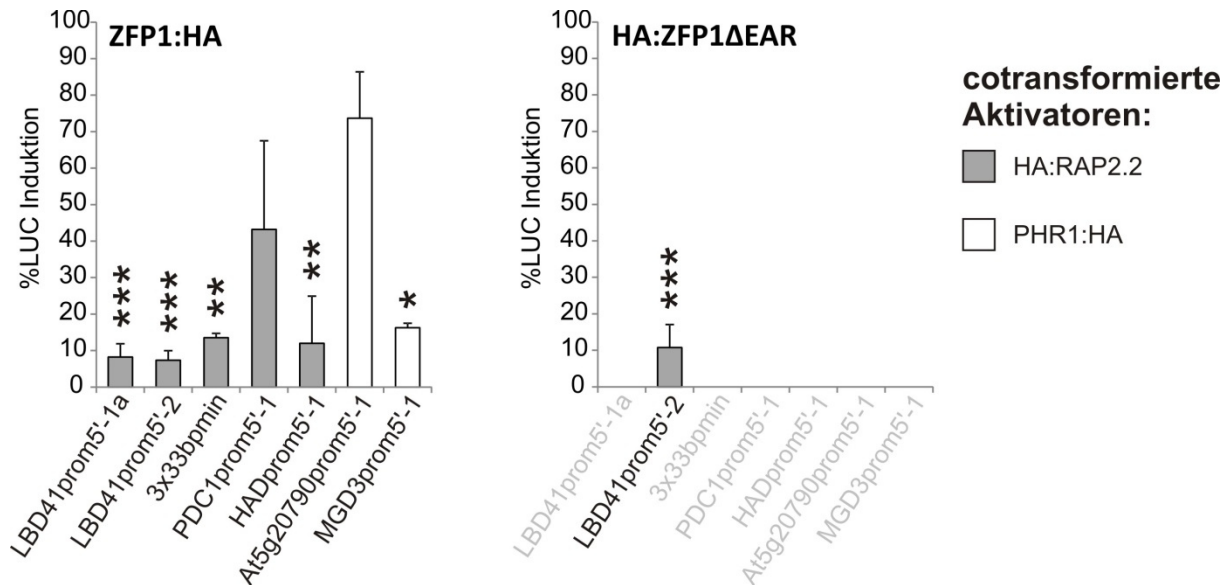


Abbildung 10: ZFP1 und eine ZFP1-Variante ohne c-terminales EAR-Motiv reprimieren hypoxieresponsive Promotoren Normalisierte Transregulationsmessung von Hämagglutinin (HA)-markiertem ZFP1 und einer c-terminal trunkeierten Variante (ZFP1ΔEAR) an Promotoren von Genen der Hypoxie-Kernantwort im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Zur Kontrolle der Hypoxiespezifität wurden Promotoren der Phosphatmangel-responsiven Gene *At5g20790* und *MGD3* benutzt. ZFP1-Varianten wurden mit Aktivatoren der Hypoxie- und Phosphatmangelantwort co-exprimiert (Legende). Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 3 Replikaten. * zeigen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Aktivatorkontrolle mit $p < 0.05$, ** mit $p < 0.01$ und *** mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). % LUC Induktion ist der Aktivitätsanteil im Vergleich zur Induktionsänderung der Aktivatorkontrolle (erklärt in Abbildung 6).

3.3.5. LBD41 reprimiert Faktoren der Sauerstoffwahrnehmung

LBD41 gehört zur DNA-bindenden Lateral Organ Boundaries (LOB)-Familie der TFs (Husbands et al., 2007). Durch seine starke, gewebsunspezifische transkriptionelle Akkumulation unter Sauerstoffmangel in *Arabidopsis thaliana* zählt *LBD41* zu den *core* hypoxieresponsiven Genen (Mustroph et al., 2009). Diese Eigenschaft ist unter *LBD41*-orthologen Genen in di- und monokotyledonen Spezies konserviert (Mustroph et al., 2010), was eine wichtige Rolle von LBD41 für die Adaption unter Sauerstoffmangel suggeriert. Durch die Präsenz eines potenziell funktionellen EAR-Motivs in der Proteinsequenz des TFs (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009; Kagale et al., 2010) und der Protein-Protein-Interaktion mit dem Co-Repressor TPL (Causier et al., 2012) wurde angenommen, dass LBD41 transkriptionsreprimierend wirkt.

Obwohl der *LBD41prom5'-1a* lediglich tendenziell durch HA:LBD41 reprimiert wurde (Abbildung 5; Abbildung 11a), wurde nicht ausgeschlossen, dass LBD41 eine stärkere Repressionskapazität für andere Promotoren, oder für Kombinationen mit anderen Aktivatoren als RAP2.2, aufwies. Es wurden die Promotoren *LBD41prom5'-2*, *PDC1prom5'-1*

und der Promotor der hypoxieresponsiven *PCO1*, *PCO1prom5'-1*, mit entweder HA:RAP2.2, HA:RAP2.12 oder HA:RAP2.3 aktiviert, um promotor- oder aktivatorabhängige Repressionseigenschaften von LBD41 zu identifizieren (Abbildung 11a). Während mit HA:RAP2.12 co-transformierte Protoplasten keine LBD41-induzierte Repression des *LBD41prom5'-2* zeigten, wurden die Aktivitäten von *PDCprom5'-1* und *PCO1prom5'-1* bei dieser Effektorkombination signifikant um jeweils etwa 50 % und 70 % reduziert (Abbildung 11a). Wurden Promotoren, darunter auch der *AT5G44730prom5'-1* durch RAP2.2 aktiviert, wies HA:LBD41 lediglich für den *PCO1prom5'-1* signifikante Repressionskapazitäten auf (Abbildung 11a). Dies stand im Gegensatz zu der Beobachtung, dass HA:LBD41 die durch RAP2.2 induzierte Transkription von nativen *PDC1*- und *ADH1*-Genen, im Vergleich zur Überexpression von *RAP2.2* allein, reduzieren konnte (Abbildung 7). RAP2.3-aktivierte Promotoren wurden hingegen stets durch LBD41 reprimiert, wenngleich nicht stärker als 60 % (Abbildung 11a). Um zu zeigen, dass LBD41 bei NERP-unabhängigen Systemen keine regulatorische Funktion hatte, wurde dessen Wirkung auf den durch PHR1 oder PHR1-like (PHL1) aktivierten *At5g20790prom5'-1* getestet. Da dieser Promotor in Anwesenheit von HA:LBD41 seine volle Aktivität behielt, gewannen die repressorischen Effekte auf Promotoren der *core* Hypoxieantwort an Bedeutung.

Andererseits boten die Daten kein klares Muster zur Klärung, ob LBD41 mit Promotorsequenzen oder mit Aktivatorproteinen interagierte, um als Repressor zu fungieren. Aus diesem Grund sollte die transkriptionelle Wirkung von LBD41 in einem Kontext untersucht werden, in welchem *group VII*-ERF TFs nicht überexprimiert vorlagen. Da insbesondere der *PCO1prom5'-1* eine geringe Basalaktivität aufwies, war nicht zu erwarten, dass ein Repressoreffekt von LBD41 detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurden 48 Aminosäuren vom C-terminus von LBD41, darunter auch das EAR-Motiv KLDLTL, durch eine Fusion des HA-Epitops mit dem VP16-Aktivatorprotein aus *Herpes simplex* ersetzt (LBD41ΔEAR:HA:VP16). Tatsächlich wies diese LBD41-Variante keine repressorischen Eigenschaften für *PCO1prom5'-1* oder *PDC1prom5'-1* auf, obwohl letzterer eine hohe, und damit reduzierbare Basalaktivität in der Effektorkontrolle mit HA:GFP besaß (Abbildung 11b). Stattdessen wurden beide Promotoren tendenziell 2-3 fach aktiviert, was auf einer Interaktion zwischen ihnen und LBD41ΔEAR:HA:VP16 basieren könnte (Abbildung 11b). In Zukunft sollte die Transkriptakkumulation putativer LBD41-Zielgene in *lbd41*-Mutanten unter Hypoxie quantifiziert werden.

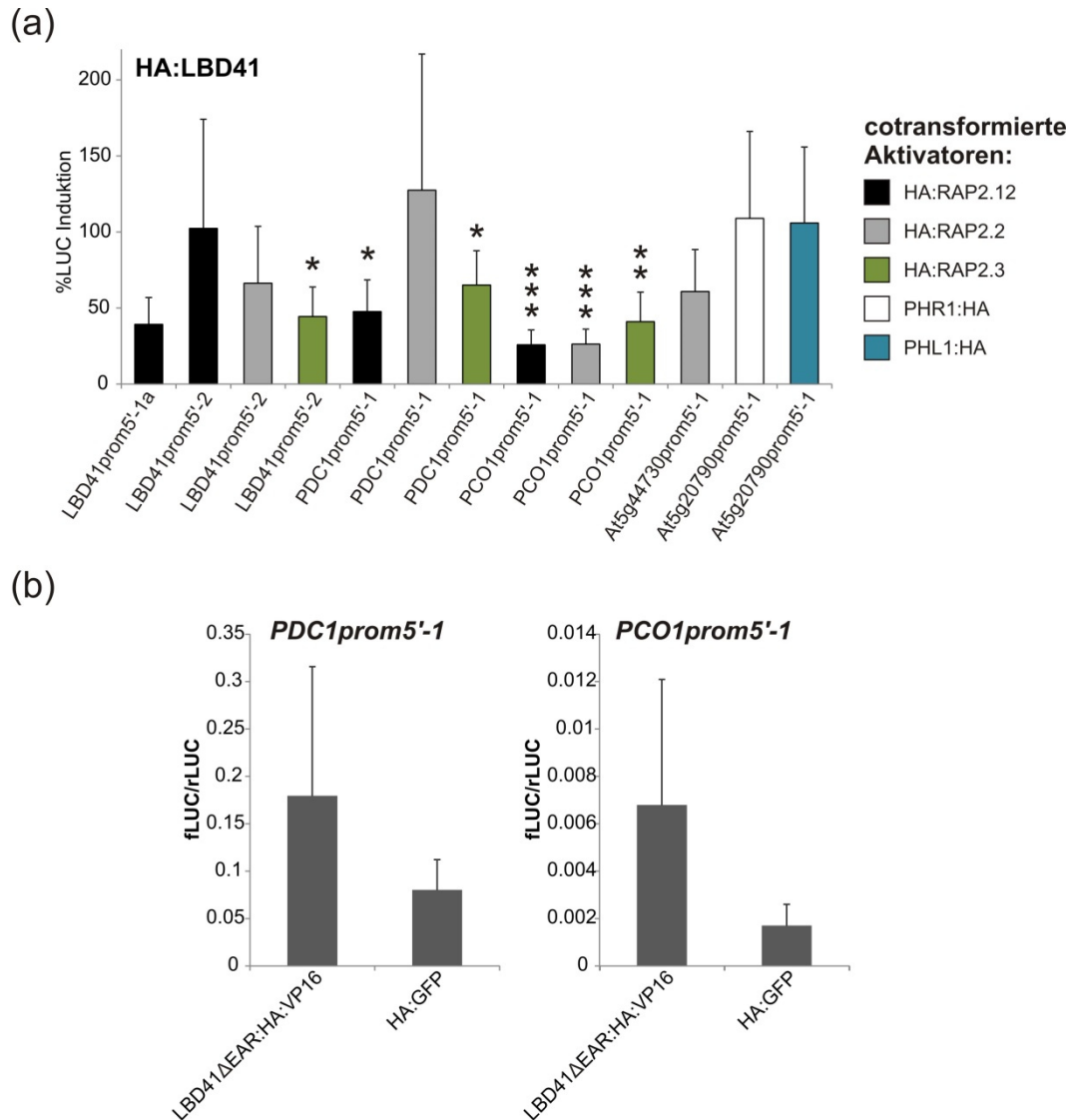


Abbildung 11: LBD41 kann die Aktivität von *group VII*-ERF-induzierten Promotoren direkt und spezifisch reprimieren (a) Normalisierte Transregulationsmessung von LBD41 an Promotoren von Genen der Hypoxie-Kernantwort im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Zur Kontrolle der Hypoxiespezifität wurden Promotoren der Phosphatmangel-responsiven Gene *At5g20790* und *MGD3* benutzt. Hämagglutinin (HA)-markiertes LBD41 wurde mit Aktivatoren der Hypoxie- und Phosphatmangelantwort co-exprimiert (Legende). Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 6 Replikaten. * zeigen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Aktivatorkontrolle mit $p < 0.05$, ** mit $p < 0.01$ und *** mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). % LUC Induktion ist der Aktivitätsanteil im Vergleich zur Induktionsänderung der Aktivatorkontrolle (erklärt in Abbildung 6). (b) Normalisierte Transregulationsmessungen mit einer LBD41-Variante, bei welcher das c-terminale EAR-Motiv durch die virale VP16-Aktivator-domäne ersetzt wurde. Messungen der Promotoraktivitäten erfolgten in Abwesenheit von anderen Effektoren. fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase des Kontrollplasmids.

3.4. Hinweise auf ökotypabhängige Existenz eines sechsten *group VII*-ERFs

Im Zuge der Bestätigung von positiven Kandidatengen des PTA-Screenings wurden die entsprechenden Klone sequenziert. Dabei ergab eine *Basic Local Alignment Search*

(BLAST)-Analyse der Sequenz des als p35S:HA:RAP2.3 annotierten Plasmids eine relativ geringe Sequenzidentität mit RAP2.3 von 92%. Ein anderer ERF-TF, COMPLEMENTING A PROTEIN KINASE MUTANT/AINTEGUMENTA (CKC/ANT) (Vergani et al., 1997), welcher aus einer der Ler-Accessions isoliert wurde, stimmte hingegen zu 99 % mit der kodierenden Sequenz der Plasmid-DNA überein. Ein Vergleich der kodierenden Sequenzen zwischen dem Klon p35S:HA:RAP2.3, *CKC/ANT*, sowie den *RAP2.3*-Loci (*AT3G16770*) aus Col-0 und Ler-0 mittels Sequenz-Alignment ergab, dass p35S:HA:RAP2.3 mit 99,9 % Sequenzidentität eine stärkere Ähnlichkeit zu *CKC/ANT* aufwies als zum *RAP2.3*-Lokus in Col-0, mit 91,7 % (Abbildung A 1). Im Gegensatz dazu wurden 97 % Sequenzidentität zwischen p35S:HA:RAP2.3 und dem *RAP2.3*-Locus im Ler-0 Genom festgestellt (Abbildung A 1). Darüber hinaus konnte die ursprüngliche Entdeckung, dass *CKC/ANT* mit dem AP2-EREBP *AINTEGUMENTA* (*AT4G37750*, *ANT*) identisch sei (Vergani et al., 1997), widerlegt werden. Beide teilten sich auf der Ebene der Proteinsequenz lediglich 9,9 % Sequenzidentität (Abbildung A 2). Eine Übereinstimmung beider Sequenzen erfolgte damit nur an der AP2-Domäne (Abbildung A 2). Im Folgenden wird das von Vergani et al., (1997) isolierte Gen, basierend auf seiner ursprünglichen Benennung, weiterhin als *CKC/ANT* bezeichnet, obwohl es nicht identisch mit *ANT* (*AT4G37750*) ist. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu RAP2.3 wurde hypothetisiert, dass *CKC/ANT* zur Familie der *group VII*-ERFs gehörte. Ein Alignment der N-terminalen Proteinsequenzen ergab, dass *CKC/ANT* das konservierte, N-terminale MCGGAI(I/L)-Motiv, welches charakteristisch für *group VII*-ERFs ist (Nakano et al., 2006), besaß (Abbildung 12a). Daraus wurde geschlossen, dass *CKC/ANT* ein RAP2.3-ähnlicher *group VII*-ERF war. Um herauszufinden, ob *CKC/ANT* eine allelische Variante von *RAP2.3* war, wurde geprüft, ob sich beide denselben Locus teilten. Dazu wurde die gDNA von 8 Ökotypen, darunter Col-0 und Ler-0 isoliert und mittels PCR und Sequenzierungen genotypisiert (Abbildung 12b). Die Accessions Col-0 und Cvi-0 besaßen je eine intronhaltige *RAP2.3*-Variante, welche über den Nachweis von nahen 3' und 5' flankierenden Sequenzen dem annotierten Genort zugeordnet werden konnten (Abbildung 12b). Die Ökotypen Ct-1, Kro-0, Kn-0, Sha, Sp-0 und Ler-0 wiesen eine intronhaltige Version von *CKC/ANT* auf, welche von denselben flankierenden Sequenzen umspannt wurde wie *RAP2.3* in Col-0 und Cvi-0 (Abbildung 12b). Dies war ein Hinweis darauf, dass es sich bei *CKC/ANT* und *RAP2.3* um ökotypspezifische Allele handelte. Im Einklang mit diesen Daten wurde auf gDNA-Ebene mittels *RAP2.3*- und *CKC/ANT*-spezifischen Primern in Col-0 und Cvi-0 nur *RAP2.3* nachgewiesen, welches aufgrund der größeren Länge im Vergleich zu dessen CDS als intronhaltig eingestuft wurde (Abbildung 12b). Überraschenderweise wurden jedoch in den anderen Ökotypen beide Varianten gefunden, wobei *CKC/ANT* möglicherweise intronhaltig und *RAP2.3* intronfrei war (Abbildung 12b). Es wurde angenommen, dass sich in diesen Ökotypen für beide Varianten getrennte Loci befinden mussten, weil Inzuchtlinien reinerbig

vorliegen. Um erste Indizien zu erhalten, ob es sich bei *CKC/ANT* um ein Pseudogen handelte, wurden Transkripte von *CKC/ANT* sowie von *RAP2.3* spezifisch nachgewiesen und stichprobenartig sequenziert. Hier bestätigte sich die Präsenz und die erwartete Genstruktur von beiden Varianten in Ct-1, Kro-0, Kn-0, Sha, Sp-0 und Ler-0. Aufgrund ihrer Expression und des Vorhandenseins eines offenen Leserahmens in beiden Varianten wurde geschlossen, dass beide für intakte Proteine kodierten. Tatsächlich war im transienten Protoplastensystem ein Translationsprodukt für HA:CKC/ANT per Westernblot nachweisbar (Abbildung 12c). Um vergleichende Aussagen über die Funktion von RAP2.3 und CKC/ANT treffen zu können, wurde auch die CDS von *RAP2.3* aus Col-0 isoliert und in nachfolgende Untersuchungen einbezogen (Abbildung 13; Abbildung 23a,c; Abbildung 24; Abbildung 30a).

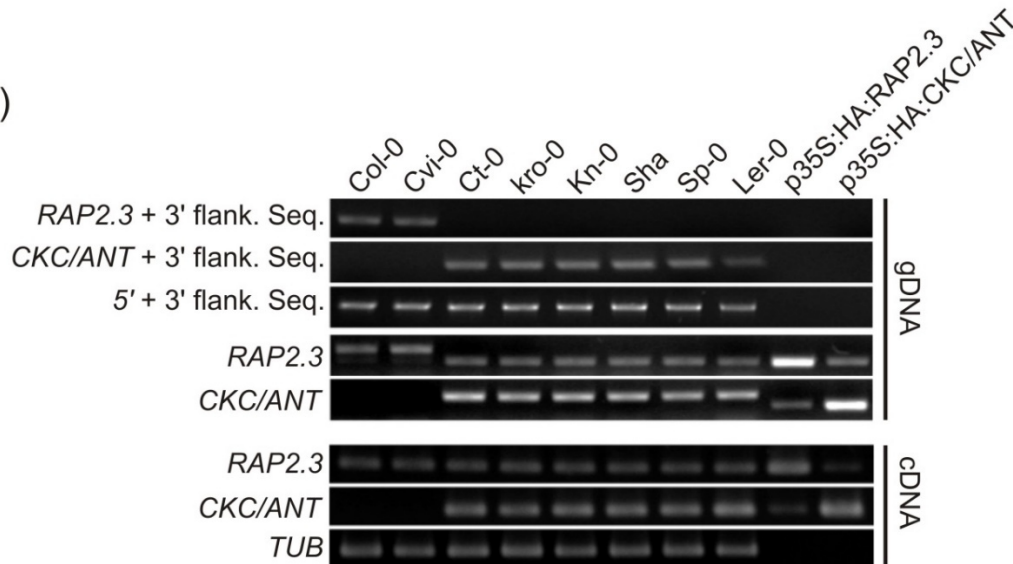
(a)

```

RAP2.3  MCGGAILSDYAP-----LVTKAKCRKLTAEEL--WSELDASAADDWGF
CKC/ANT MCGGAILSDYAP-----LVTKAKCRKLTAEEL--WSELDASAADDWGF
RAP2.2  MCGGAILSDFI PPPRSLRVTNEFIWPD LKNKVKASKKRSNKRSDFFDLDDDFEADFQCF
RAP2.12 MCGGAILSDFI PPPRSRRVTSEFIWPD LKKNLKGSKSKSNRSDFFDFAEFADFQCF
HRE2    MCGGAILSDFIW-----SKSESEPS---QLGSVSSR---
HRE1    MCGGAVISDYIAP-----EKIARSSGKSSWRSNGVFDCSIYDFDGNFDEL

```

(b)



(c)

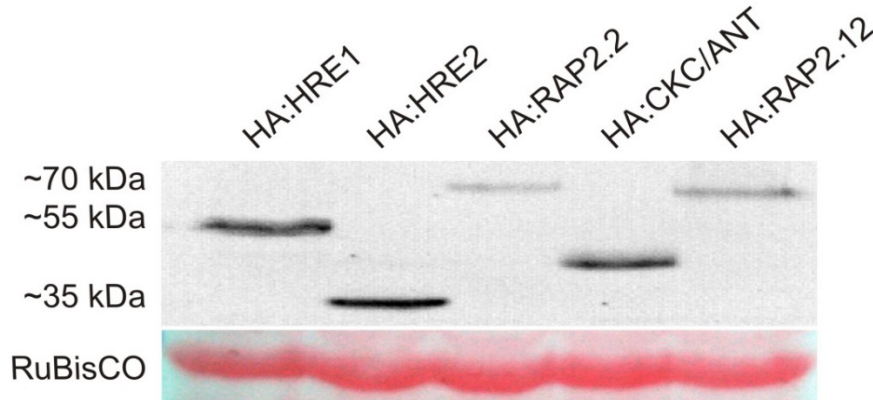


Abbildung 12: Einige *Arabidopsis* Accessions weisen eine kodierende *RAP2.3* Isoform auf (a) Alignment des N-terminalen Bereichs von CKC/ANT (Vergani et al., 1997) mit RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12, HRE1 und HRE2 enthüllt dessen Verwandtschaft mit *group VII*-ERFs. **(b)** Repräsentatives Ergebnis von je mindestens 3 qualitativen und semiquantitativen RT-PCR Analysen mit Primerpaaren, spezifisch für die 3'- und 5' flankierende Region des *RAP2.3* Locus (3'/5' flank. Seq.; Primer: RAP23_fw4 und _rev4), sowie für *RAP2.3* (Primer: RAP23_fw3+_rev6a oder RAP23_fw8+_rev3) und *CKC/ANT* (Primer: RAP23_fw3+_rev6 oder RAP23_fw8a+_rev3). gDNA und mRNA wurden aus 8 *Arabidopsis thaliana* Ökotypen isoliert und analysiert. Kontrollplasmide enthielten prozessierte, kodierende Sequenzen von *RAP2.3* und *CKC/ANT*. Das Referenzgen *Tubulin* (*TUB*) diente zur Kontrolle der DNA-Qualität und -Quantität. **(c)** Westernblot zeigt Expression von Hämagglutinin-markierten *group VII*-ERFs und CKC/ANT. Angaben zum Molekulargewicht wurden mittels Proteinmarker abgeschätzt. RuBisCO diente als Ladungskontrolle.

3.5. RAP2.2 und RAP2.12 sind redundante Hauptaktivatoren der Hypoxieantwort

Es ist wahrscheinlich, dass RAP2.2 und RAP2.12 redundante und, gegenüber anderen TFs, prädominante Rollen bei der Induktion hypoxieresponsiver Gene besitzen (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Licausi et al., 2011b). Darüber hinaus wurde während der Anfertigung dieses Manuskripts und im Zuge dieser Arbeit eine positiv regulatorische Funktion von RAP2.3 für einen hypoxieresponsiven Promotor festgestellt (Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015; Abbildung 4). Um einen weiteren Beleg für die Redundanz der drei *group VII*-ERFs zu erhalten, wurden N-terminal stabilisierte Versionen stabil in *Arabidopsis thaliana* überexprimiert. Da die *ADH1* ein etabliertes Hypoxiemarkergen darstellt und zudem von *group VII*-ERFs kontrolliert wird (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Licausi et al., 2011b; Papdi et al., 2015), wurde die ADH-Enzymaktivität als Maß für die Transaktivität von RAP2.2, RAP2.12 und RAP2.3 unter Kontrollbedingungen gemessen (Abbildung 13). Im Vergleich zu Col-0, welcher der genetische Hintergrund aller in diesem Experiment untersuchten Pflanzen war, war die ADH Aktivität im *prt6*-Hintergrund etwa um den Faktor 4 signifikant erhöht (Abbildung 13). In zwei RAP2.12-Überexpressionslinien (RAP2.12 OE1 und 2) sowie in einer von zwei RAP2.2-Überexpressionslinien (RAP2.2 OE2) konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der ADH-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 13). Da diese in allen Fällen deutlich über der in *prt6* gemessenen Aktivität lagen, wurde abgeleitet, dass die NERP-abhängige Stabilisierung von *group VII*-ERFs zur Erklärung dieses *prt6*-Phänotyps wahrscheinlich ausreichte. Interessanterweise zeigten auch zwei getestete *RAP2.3*-Überexpressionslinien (RAP2.3 OE1 und 2) eine signifikant erhöhte ADH-Aktivität gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 13). Damit wurde die neue Rolle von RAP2.3 als positiver Regulator der Hypoxieantwort weiter untermauert.

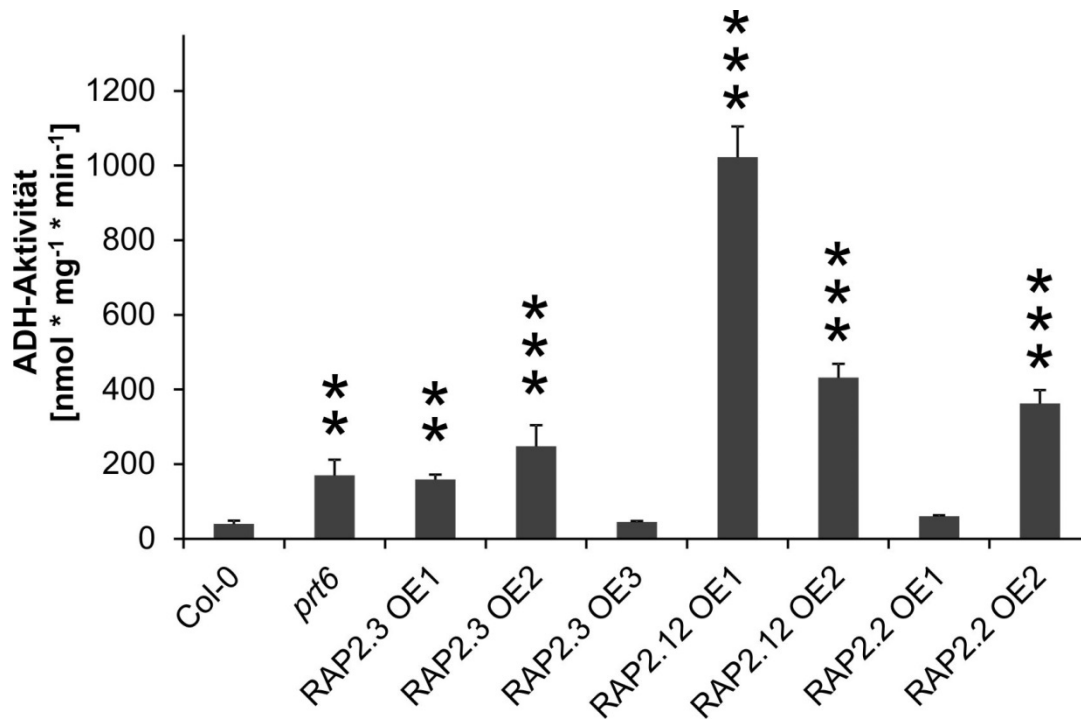


Abbildung 13: Stabile *group VII*-Überexpression steigert die ADH-Aktivität. Aktivität des Gärungsenzyms Alkoholdehydrogenase (ADH) in *group VII*-ERF Überexpressionslinien, in [nmol*mg⁻¹ Gesamtprotein*min⁻¹]. Col-0 diente zu Kontrolle der Basalaktivität und *prt6* diente als Positivkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von vier Replikaten. ** zeigen signifikante Unterschiede zur Col-0 ADH-Aktivität mit $p < 0.01$ und *** mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test, unteres Signifikanzlevel betrug $p < 0.05$).

Unterschiede in den Transaktivierungskapazitäten von RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12 spiegeln keine physiologischen Unterschiede wider. Es galt deshalb herauszufinden, in welchem Maße RAP2.2 und RAP2.12 das Fehlen des jeweils anderen Faktors kompensieren konnten und ob beide Faktoren zur Hypoxieinduktion von Genen ausreichten. Zu diesem Zweck wurden homozygote Einzel- und Doppel-*knock out*-Linien unter Sauerstoffmangel untersucht. Die *rap2.12-knock out*-Linie besaß eine T-DNA-Insertion im zweiten Exon von *RAP2.12*. Der genetische Hintergrund dieses Allels war der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0. Es existieren außerdem zwei unabhängige *rap2.2* T-DNA-Allele im Col-0 Hintergrund (*rap2.2-1* und *rap2.2-2*) welche jedoch aufgrund nachweisbarer *RAP2.2* Transkripte hypomorph sind (Hinz et al., 2010). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer bisher noch nicht beschriebenen Transposon-Insertionslinie GT5337 gearbeitet, welche ein mutiertes Allel von *RAP2.2* im Ler-0 Hintergrund besitzt (<http://genetrapp.cshl.edu>; Sundaresan et al., (1995)). Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde getestet, ob es sich bei den untersuchten Mutanten um Null-Linien handelte. Mit *RAP2.2*- und *RAP2.12*-spezifischen Primern wurde die Expression beider Gene in beiden Wildtypen nachgewiesen (Abbildung 14). Im Vergleich dazu fehlten *RAP2.12*- und *RAP2.2*-Transkripte in den

jeweiligen Einzelmutanten. Das Fehlen der Transkripte basierte nicht auf einer Degradation von Nukleinsäuren, da sich das Referenzgen *TUB* in allen Proben nachweisen ließ (Abbildung 14). Die als Nulllinien bestätigten Pflanzen wurden genutzt, um mittels Kreuzung homozygote Doppelmутanten herzustellen. Da sich die mutierten Allele in unterschiedlichen genetischen Hintergründen befanden, wurden auch F₂-Nachkommen isoliert, welche homozygot für beide Wildtypallele waren. In zwei Kreuzungen konnte das Fehlen beider Transkripte nachgewiesen werden, während Kreuzungen der genetischen Hintergründe wildtypische Allele aufwiesen (Abbildung 14). Alle Mutanten und Wildtypen wurden für nachfolgende Experimente genutzt.

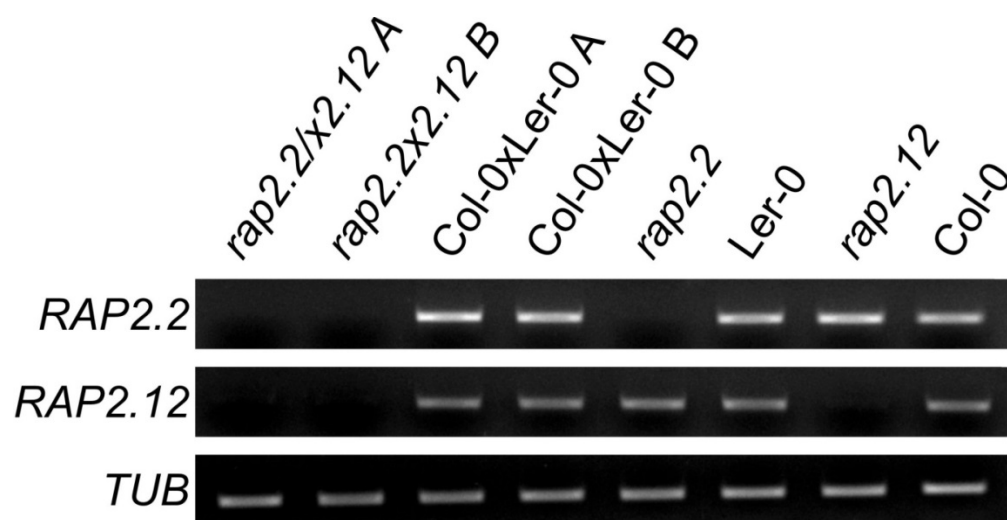


Abbildung 14: T-DNA Insertionen erzeugen *rap2.2* und *rap2.12*- Nullallele Repräsentatives Ergebnis von drei semiquantitativen RT-PCR Analysen mit *RAP2.2*- und *RAP2.12*- spezifischen Primern in Col-0 und Ler-0 Ökotypen, sowie T-DNA Insertionslinien und deren Kreuzungen in der F₂ Generation. Das *rap2.2* T-DNA-Allel befand sich im Ler-0 Hintergrund und *rap2.12* befand sich in Col-0. Das Referenzgen *Tubulin* (*TUB*) diente zur Kontrolle der cDNA-Qualität und Quantität. Die Zyklenzahl betrug 30.

Sieben Tage-alte Keimlinge wurden für 2 h in einer belichteten Stickstoffatmosphäre inkubiert. Anschließend wurden mittels qRT-PCR die Transkriptmengen der zu den 49 „core“ hypoxieresponsiven Genen zählenden *LBD41*, *PCO1*, *PCO2*, *ADH1* und *PDC1* quantifiziert (Abbildung 15). Sauerstoffmangel verursachte im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine starke Erhöhung aller untersuchten Transkripte in den Ökotypen Col-0 und Ler-0. Interessanterweise erschien die Expressionsstärke bei Col-0 stets tendenziell höher als bei Ler-0, was für die Gene *LBD41* und *PDC1* sogar statistisch signifikant war (Abbildung 15). Diese Beobachtung deutete auf natürliche Variationen bei der trans- oder cis-Regulation der Sauerstoffmangelantwort hin. Das Fehlen von *RAP2.2* im Ler-0 Hintergrund führte zu einer

verminderten Akkumulation der untersuchten Transkripte, was die Bedeutsamkeit von RAP2.2 bei der Hypoxieantwort bestätigte (Abbildung 15). Dennoch konnten in der Mutante mindestens 40 % der Transaktivierungskapazitäten des zugehörigen Wildtyps erreicht werden, und die Signifikanzniveaus für die gemessenen Unterschiede der Gene *LBD41*, *PCO1*, *PDC1* und *ADH1* waren schwach (etwa $p=0,05$). Ähnliche Ergebnisse wurden beim Vergleich zwischen *rap2.12*-Mutanten und Col-0 erzielt, was auch die Relevanz von RAP2.12 bei der differentiellen Genexpression bei Hypoxie bestätigte (Abbildung 15). Die Ergebnisse der Einzelmутanten deuteten außerdem darauf hin, dass die jeweilige Abwesenheit des einen TFs partiell kompensiert werden konnte.

Da RAP2.2 und RAP2.12 unter den *group VII*-ERFs die höchste Sequenzähnlichkeit aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass sich beide gegenseitig komplementieren können (Licausi et al., 2011b). Um dies zu testen, wurden die homozygoten Doppelmutanten in die Untersuchung mit einbezogen. Kreuzungen beider Wildtypen wiesen unter Hypoxie Transkriptlevel auf, die etwa in gleicher Höhe des Ler-0 Ökotyps lagen (Abbildung 15). Die *rap2.2/rap2.12* Doppelmutanten erreichten hingegen eine sauerstoffmangelinduzierte Aktivierung der getesteten Gene von lediglich 1 % - 5 %, verglichen mit ihren Kontrolllinien (Abbildung 15). Die Unterschiede zu den Wildtypkreuzungen, welche bei allen untersuchten Markergenen beobachtet wurden, waren für alle Gene, bis auf *PCO2* signifikant und bestätigten, dass RAP2.2 und RAP2.12 essenzielle und funktionell redundant agierende TFs für die vollständige Hypoxieantwort waren (Abbildung 15).

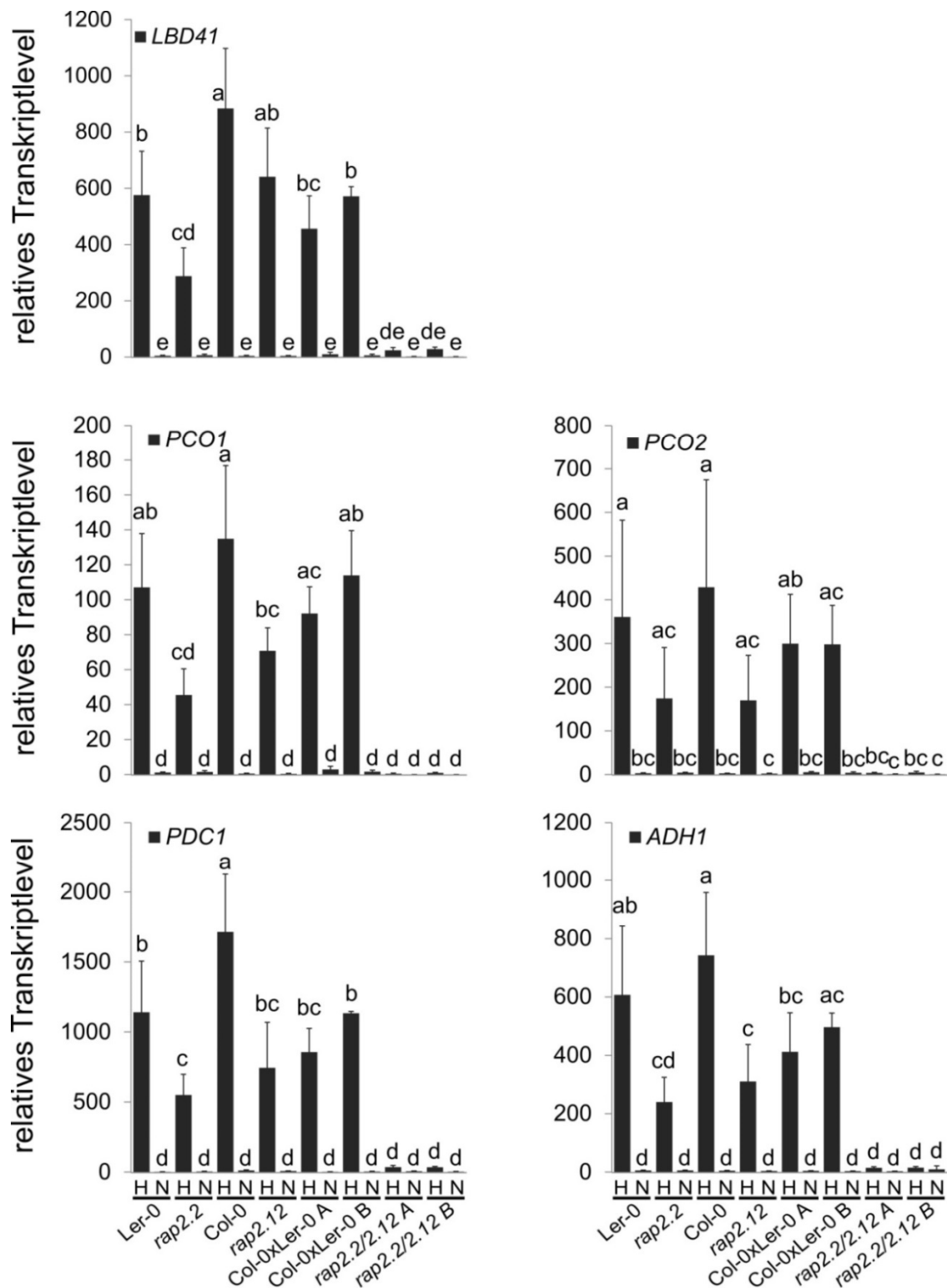


Abbildung 15: RAP2.2 und RAP2.12 sind redundante Hauptaktivatoren der Hypoxie core
Antwort qRT-PCR Analyse von Hypoxiemarkergenen aus 7 d-alten Keimlingen des Col-0 Wildtyps, Ler-0, sowie *rap2.2*- und *rap2.12* Einzel- und je zwei Doppelmutanten (*rap2.2/rap2.12*) und Wildtypkreuzungen (*Col-0xLer-0*) unter Kontrollbedingungen (N) und 2 h Hypoxie (H). Relative Transkriptlevel wurden auf den *Elongationsfaktor 1 α* (*EF-1α*) normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

Obwohl die statistische Analyse ergab, dass in den Doppelmutanten keine signifikante Transkripterhöhung unter Hypoxie gegenüber Kontrollbedingungen stattfand, wurden tendenzielle Unterschiede beobachtet (Abbildung 15). Eine zweite Analyse, unter Ausschluss der Expressionsdaten von Wildtypen und Einzelmutanten ergab, dass deren Werte die subtilen, signifikanten Unterschiede zwischen hypoxiebehandelten Doppelmutanten überlagert haben (Abbildung 16a). Tatsächlich konnte eine geringfügige, aber signifikante, hypoxiebedingte Erhöhung der Transkription der Gene *PCO2*, *LBD41*, *ADH1* und *PDC1* in der exemplarisch gewählten Mutante *rap2.2x2.12 A* festgestellt werden (Abbildung 16a). Dies deutete darauf hin, dass mindestens ein dritter Faktor eine schwache, redundante Rolle bei der hypoxieinduzierten Genaktivierung einnahm. Unter Ausschluss der Expressionsdaten aller hypoxiebehandelten Proben konnte zudem festgestellt werden, dass das Fehlen von RAP2.2 und RAP2.12 bereits unter normalen Sauerstoffbedingungen die Genexpression von *PCO1* und *PCO2* signifikant negativ beeinflusste (Abbildung 16b). Tendenziell konnte dieses Phänomen auch für *LBD41* beobachtet werden (Abbildung 16b). Dies ließ auf eine nukleare Funktion von RAP2.2 und RAP2.12 im nicht hypoxischen Zustand schließen. Es ist aber auch möglich, dass sich trotz atmosphärischen Bedingungen ein interner Sauerstoffmangel im pflanzlichen Gewebe bildete, der für die nukleare Akkumulation beider TFs ausreichte.

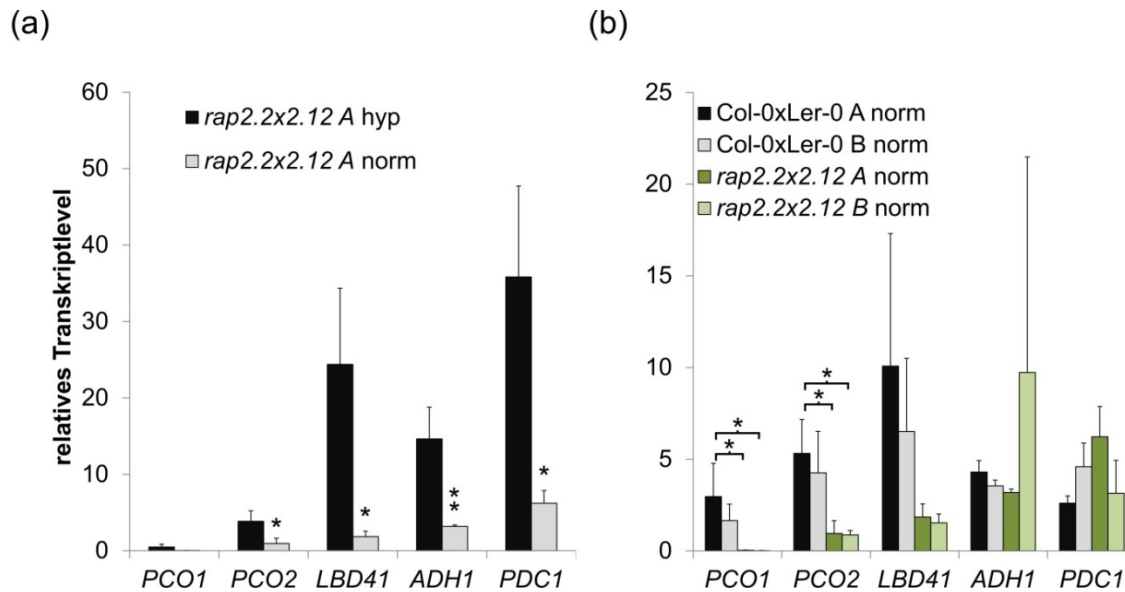


Abbildung 16: Die *rap2.2/rap2.12* Doppelmutante enthält subtile Hypoxie-Regulationsmechanismen (a) qRT-PCR Analyse aus Abbildung 15. Ausgewertet wurden nur Daten einer *rap2.2/rap2.12* Doppelmutante unter Kontrollbedingungen (norm) und 2 h Hypoxie (hyp). (b) qRT-PCR Analyse aus Abbildung 15. Ausgewertet wurden nur zwei *rap2.2/rap2.12* Doppelmutanten und zwei Kreuzungen mit wildtypischen Allelen (*Col-0xLer-0*) unter Kontrollbedingungen (norm) und 2 h Hypoxie (hyp). * zeigen signifikante Unterschiede zum hypoxieinduzierten Wert bei (a) und zwischen gekennzeichneten Genotypen bei (b) mit $p < 0.05$ und ** mit $p < 0.01$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

Eine Veränderung des Induktionsniveaus von Genen unter Hypoxie kann die Anfälligkeit oder Toleranz von Pflanzen für diese Stressbedingung verändern (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Es wurde nachfolgend analysiert, ob die starke Abnahme der sauerstoffmangelabhängigen Induktion von Hypoxiemarkergenen in Doppelmutanten die Überlebensrate dieser Pflanzen unter Überflutungsbedingungen beeinflusste. Nach 3 d Überflutung in Dunkelheit und einer Erholungsphase von 15 d unter Kurztagbedingungen waren etwa 50 % der Individuen des *Col-0* Wildtyps in der Lage, neues Sprossgewebe zu regenerieren, während die andere Hälfte abstarb (Abbildung 17). Obwohl die *rap2.12*-Mutante eine geringere Geninduktion unter Hypoxie aufwies, zeigten Individuen dieser Linie eine tendenziell um 20 % erhöhte Überlebensrate als *Col-0*, was sich auch im Frischgewicht und der Anzahl regenerierter Blätter widerspiegelte (Abbildung 17). Die *rap2.2*-Mutante zeigte hingegen eine deutlich geringere Überlebensrate von etwa 10 %. Dies war jedoch nicht eindeutig auf das Fehlen des TFs zurückzuführen, da auch der zugehörige *Ler-0* Ökotyp eine starke Anfälligkeit unter den hier angewandten Stressbedingungen aufwies (Abbildung 17). Es fiel auf, dass *Ler-0* ein geringeres Wachstum als *Col-0* aufwies, was möglicherweise auf eine kürzere vegetative Phase unter Kurztagbedingungen zurückzuführen war. Eine ebenso geringe Überlebensrate wie *rap2.2* und *Ler-0* zeigten die

beiden Kreuzungen *rap2.2x2.12 A* und *B* (Abbildung 17). Es ist wahrscheinlich, dass deren Anfälligkeit in der Doppelmutation begründet lag, da ihr Phänotyp unter Kontrollbedingungen dem von Col-0 glich. Jedoch ist eine eindeutige Aussage zur Relevanz von RAP2.2 und RAP2.12 für das Überleben unter Sauerstoffmangel nicht möglich, da sich Genomanteile der anfälligen Ler-0-Linie in beiden Doppelmutanten befanden.

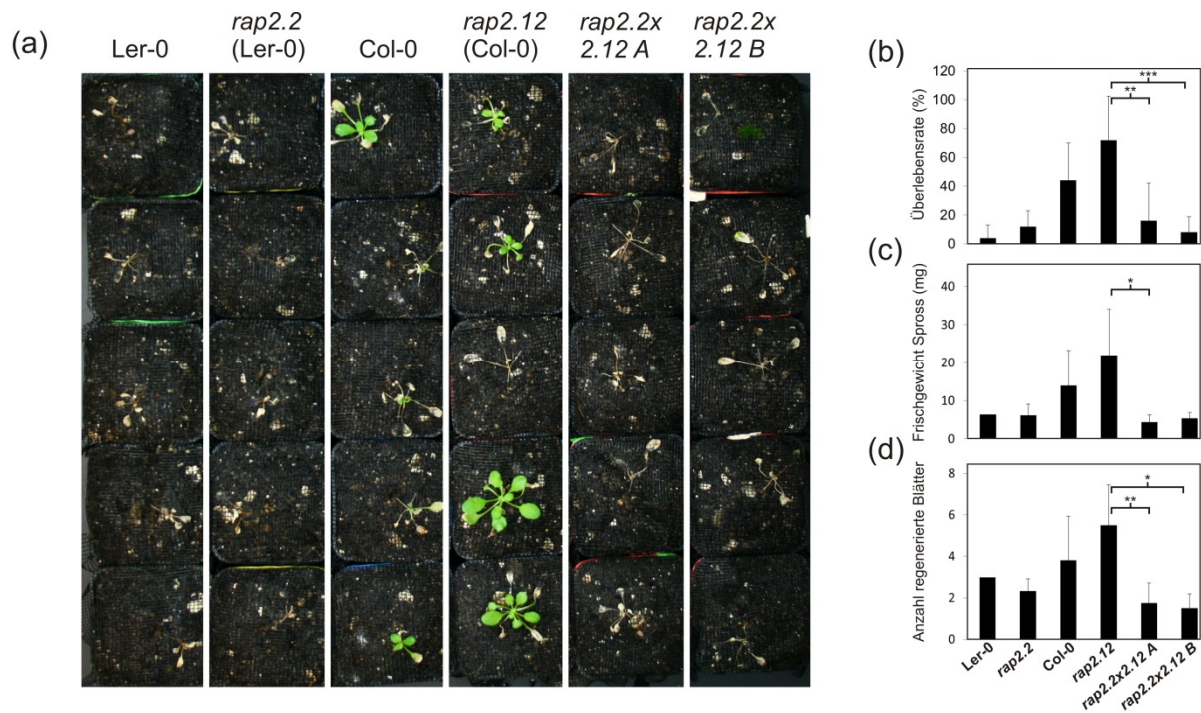


Abbildung 17: *rap2.2/rap2.12* Doppelmutanten und Ler-0 sind stark Überflutungsanfällig (a) Repräsentativer Phänotyp von *Arabidopsis* Ökotypen und *group VII-ERF* Mutanten, welche als 3 Wochen-alte Pflanzen für 3 d in Dunkelheit überflutet wurden und für weitere 2 Wochen unter Kurztagbedingungen regenerierten. **(b)** Mittlere Überlebensrate +/- Standardabweichung [%] von 25 Individuen in insgesamt 5 biologischen Replikaten. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede mit $p < 0.01$ und *** mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test, unteres Signifikanzniveau $p < 0.05$) **(c)** Mittleres Frischgewicht regenerierter Sprosse +/- Standardabweichung [mg] von 1 bis 18 Individuen pro Genotyp aus insgesamt 5 biologischen Replikaten. * kennzeichnet signifikanten Unterschied mit $p < 0.05$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). **(d)** Mittlere Blattanzahl (ab Blattgröße von 1 mm²) regenerierter Sprosse +/- Standardabweichung von 1 bis 18 Individuen pro Genotyp aus insgesamt 5 biologischen Replikaten. * kennzeichnet signifikanten Unterschied mit $p < 0.05$ und ** mit $p < 0.01$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test).

3.6. RAP2.2 ist ein spezifischer und direkter Aktivator hypoxieresponsiver Gene

RAP2.2 spielt eine wichtige Rolle bei der Genaktivierung unter hypoxischen Bedingungen und ist in der Lage, Promotoren von hypoxieresponsiven Genen anzuschalten (Hinz et al., 2010; Weits et al., 2014). Obwohl seine Eigenschaft als transkriptioneller Aktivator bereits in

Hefe belegt wurde (Welsch et al., 2007), war noch nicht klar, ob RAP2.2 auch *in planta* als Aktivator fungiert und ob es seine Zielgene direkt oder indirekt reguliert. Um diese offenen Fragen zu beantworten, wurde im ersten Schritt überprüft, ob RAP2.2 hypoxieresponsive Markergene transkriptionell aktivieren kann. Zu diesem Zweck wurde eine N-terminal stabilisierte HA:RAP2.2 Variante in Mesophyllprotoplasten des Col-0 Ökotyps überexprimiert. Die differenzielle Genregulation wurde anschließend mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert (Abbildung 19a). Im Vergleich zur Überexpression eines *HA:GFP*-Konstruktes, welches zur Transformationskontrolle diente, erschienen die Transkripte der Hypoxie-Markergene *LBD41*, *PDC1*, *At4g10270* und *At5g10040* in Anwesenheit von HA:RAP2.2 deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu blieb das Transkriptionslevel des Referenzgens *TUB* unverändert, was auf eine hypoxiespezifische Transaktivierungseigenschaft von RAP2.2 hindeutete (Abbildung 19a). Diese Spezifität wurde in einem transienten Reportergergenassay bestätigt. Hier waren sowohl HA:RAP2.2 als auch HA:RAP2.12 in der Lage, den *LBD41prom5'-1a* zu transaktivieren (Abbildung 4; Abbildung 18). Promotoren der Phosphatmangelgene *MONOGALACTOSYL DIACYLGLYCEROL SYNTHASE 3 (MGD3)* (*MGD3prom*) und *At5g20790* (*At5g20790prom*) blieben jedoch in Anwesenheit der beiden ERF TFs auf einem basalen Aktivitätslevel (Abbildung 18). Die Funktionalität von *MGD3prom*- und *At5g20790prom*-Reporterkonstrukten wurde dadurch bestätigt, dass beide signifikant durch die Anwesenheit der Phosphatmangelregulatoren PHR1 und PHL1 aktiviert wurden (Abbildung 18).

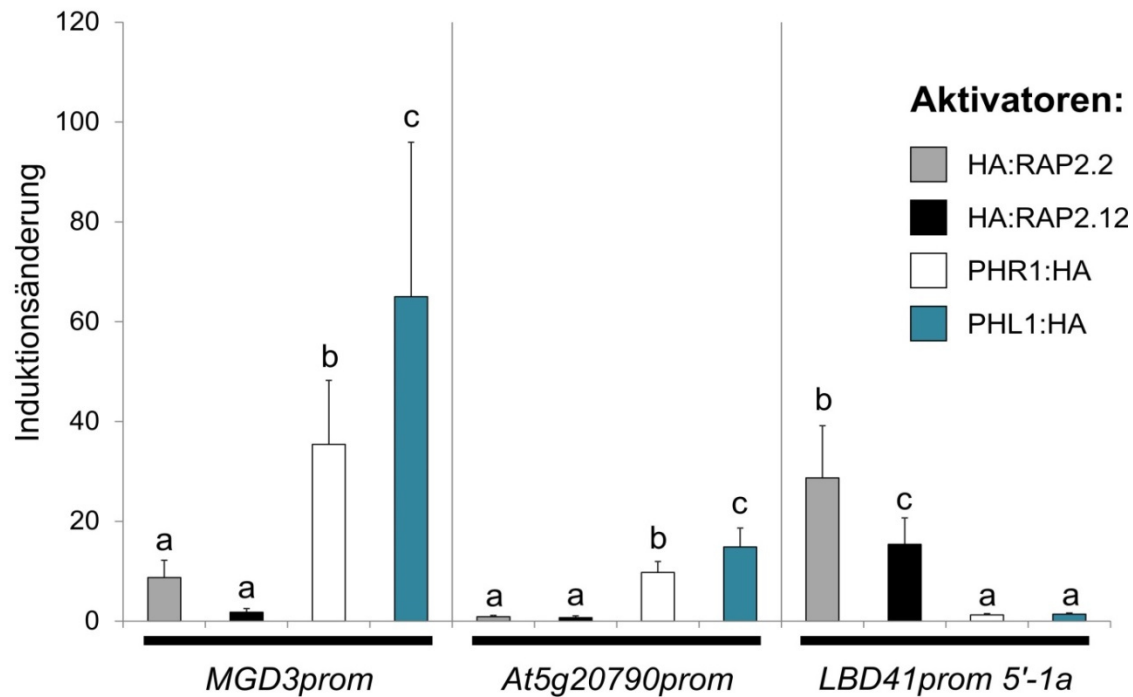


Abbildung 18: RAP2.2 und RAP2.12 sind promotorspezifische Transkriptionsfaktoren

Normalisierte Transaktivitätsmessung von Hämagglutinin markierten Transkriptionsfaktoren (Legende) an Promotoren von Genen der Hypoxieantwort (*LBD41prom5'-1a*) und Phosphatmangelantwort (*MGD3prom* und *At5g20790prom*) im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von je 6 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). Zur Berechnung der Induktionsänderung wurden fLUC/rLUC-Verhältnisse von Effektor enthaltenden Proben durch fLUC/rLUC-Verhältnisse der Effektorkontrolle mit kodierendem HA:GFP geteilt. fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnten noch keine Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die betroffenen Gene primär oder sekundär von RAP2.2 aktiviert wurden. Um zunächst die Prämisse zu testen, ob RAP2.2 generell über Transaktivierungseigenschaften verfügt, wurde eine GAL4UAS-Bindedomäne (BD) N-terminal an RAP2.2 fusioniert (BD:RAP2.2), wodurch der TF in einem hypoxieunabhängigen System untersucht werden konnte. Nach transienter Co-Transformation von Mesophyllprotoplasten mit BD:RAP2.2 und einem 4xGAL4UAS:LUC Reporter wurde die LUC-Aktivität gemessen. Um einen Nebeneffekt der Überexpression von *RAP2.2* auszuschließen, wurde in einem Kontrollansatz auch das HA:RAP2.2 Konstrukt überexprimiert (Abbildung 19b). Tatsächlich konnte die HA:RAP2.2 Variante die basale Aktivität von 4xGAL4UAS:LUC nicht signifikant erhöhen (Abbildung 19b). Im Gegensatz dazu ergab sich eine etwa 23-fache, signifikante Erhöhung der Basalaktivität in Anwesenheit von BD:RAP2.2 (Abbildung 19b). Dies bestätigte die

Annahme, dass es sich bei RAP2.2 auch *in planta* um einen transkriptionellen Aktivator handelte.

Ob diese Transaktivierungseigenschaften direkt oder indirekt auf wichtige Hypoxiemarkergene übertragen werden, wurde ebenfalls im transienten Protoplastensystem geprüft. Dazu wurde C-terminal die hormonbindende Domäne (HBD) eines Glukokortikoid-rezeptors an eine N-terminal stabilisierte RAP2.2-Variante fusioniert ((MA)RAP2.2:HBD). Das Konstrukt wurde transient im Protoplastenzytosol von *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Durch Zugabe von Dexamethason (DEX) wurden dessen nukleare Translokation und damit die Transaktivität von RAP2.2 ausgelöst. Dreißig min vor DEX-Zugabe wurde Cycloheximid (CHX) zu den transformierten Protoplasten gegeben, wodurch die Proteinbiosynthese inhibiert wurde. In Kontrollansätzen wurde DEX durch Ethanol und CHX durch DMSO ersetzt. 4 h nach DEX-Behandlung wurde die RNA isoliert, um die differenzielle Genregulation von Schlüsselgenen der Hypoxieantwort zu untersuchen (Abbildung 19c). Die Wirkung von CHX wurde in einer semiquantitativen PCR bestätigt, bei der das CHX Markergen (1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 8) ACS8 in Anwesenheit von CHX stärker akkumulierte als nach DMSO-Behandlung (Abbildung 19c). Mittels qRT-PCR wurde demonstriert, dass die Transkripte der meisten untersuchten Gene signifikant akkumulierten, wenn (MA)RAP2.2:HBD und gleichzeitig DEX anwesend war. DEX-Behandlung in Abwesenheit von (MA)RAP2.2:HBD oder Ethanol- und CHX-Behandlung in Anwesenheit von (MA)RAP2.2:HBD führten hingegen nicht zur gesteigerten Transkription (Abbildung 19c). Obwohl *PCO1*-Transkripte tendenziell durch kernlokalisiertes (MA)RAP2.2:HBD verstärkt akkumulierten, war der Unterschied zu den Kontrollen nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigten *ADH1*, *PDC1* und *PCO2* in Anwesenheit von DEX und CHX eine signifikant erhöhte Transkription, welche durch ein Fehlen von CHX sogar weiter verstärkt wurde (Abbildung 19c). Auch *LBD41* reagierte mit einer signifikanten Transkriptionssteigerung in Anwesenheit von DEX und CHX, jedoch wurde es in Abwesenheit von CHX schwächer exprimiert. Das *HRA1*-Transkript zeigte hingegen unter beiden Behandlungen eine ähnlich starke Akkumulation im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 19c). Die Ergebnisse deuteten auf eine direkte Aktivierung aller untersuchten Gene durch RAP2.2 hin. Darüber hinaus gaben sie Hinweise auf weitere regulatorische Schritte, die durch RAP2.2 induziert wurden und einer *de novo*-Proteinbiosynthese bedurften. Diese beinhalteten im Speziellen sekundäre Aktivitätssteigerungen von *ADH1*, *PDC1* und *PCO2* sowie die Repression von *LBD41*.

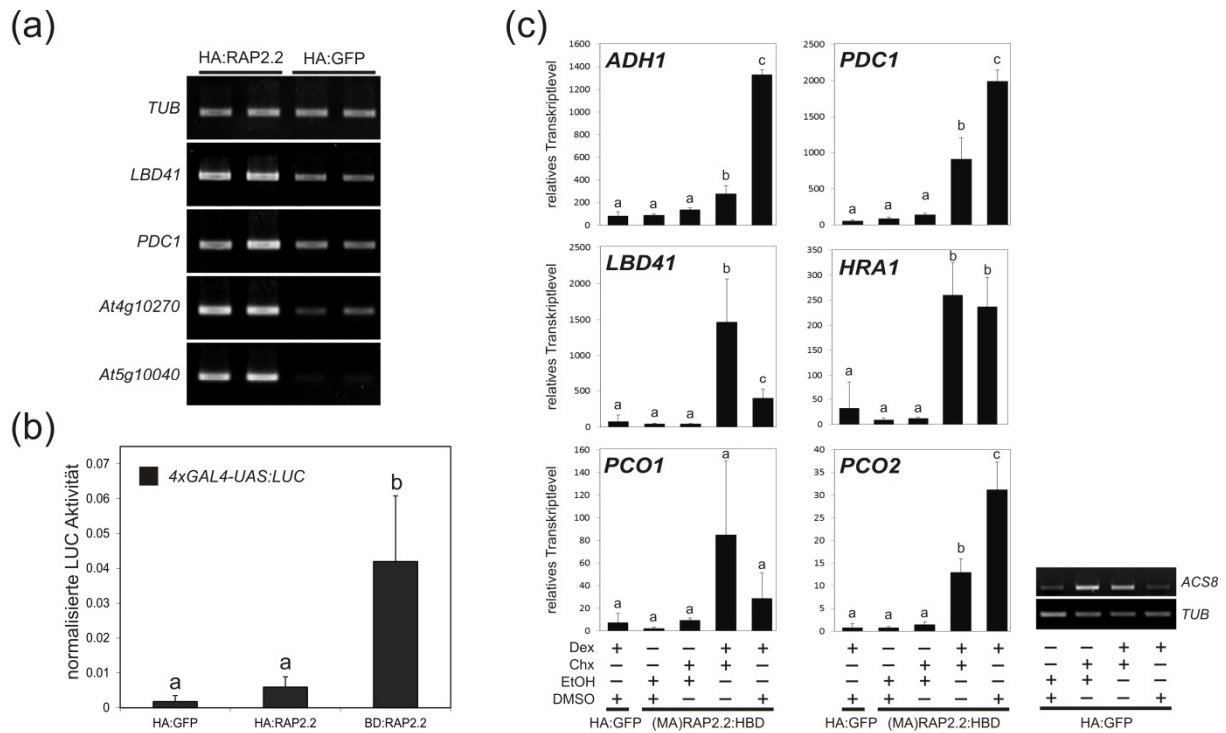


Abbildung 19: RAP2.2 ist ein direkter Aktivator hypoxieresponsiver Gene (a) Repräsentatives Ergebnis von mindestens 3 semiquantitativen RT-PCR-Analysen von transient transformierten Mesophyllprotoplasten des Col-0 Wildtyps. Transkriptmengen von hypoxieregulierten Genen wurden in Anwesenheit von Hämagglutinin (HA)-markiertem HA:RAP2.2 gemessen. Die basale Transkription wurde in Anwesenheit von HA:GFP kontrolliert. Das Referenzgen *Tubulin* (*TUB*) diente zur Kontrolle der cDNA-Qualität und -Quantität. (b) Normalisierte Transaktivitätsmessung einer UAS Bindedomäne (BD)-RAP2.2 Fusion (BD:RAP2.2) am 4xGAL4UAS Promotor im transienten, protoplastenbasierten Luciferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Hämagglutinin (HA) markiertes RAP2.2 (HA:RAP2.2) diente zur Kontrolle der Autoaktivierung und HA:GFP zur Kontrolle der Basalaktivität. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von je 7 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). Normalisierte LUC-Aktivität ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids. (c) qRT-PCR Analyse von Hypoxiemarkergenen aus Protoplasten einer 3x33bpmin:LUC-Reproterlinie (Abbildung 22) im Col-0 Hintergrund, welche transient entweder HA:GFP oder (MA)RAP2.2:HBD exprimierten. CHX und DMSO wurden 30 min vor DEX und EtOH appliziert und Protoplasten wurden für weitere 4 h unter Langtagbedingungen inkubiert. Relative Transkriptlevel wurden auf den *Elongationsfaktor 1 α* (*EF-1 α*) normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). Die Wirkung von CHX wurde in einer semiquantitativen RT-PCR kontrolliert, mit 1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 8 (*ACS8*) als CHX Markergen und *Tubulin* (*TUB*) als Referenzen.

3.7. Phylogenetische und molekulare Zergliederung hypoxieresponsiver Promotoren

Es ist wahrscheinlich, dass die funktionelle Redundanz von RAP2.2 und RAP2.12 auf einer gemeinsamen TFBS beruht (Bernard et al., 2012). Darüber hinaus existieren nur

Hypothesen über eine *group VII-ERF* spezifische TFBS (Licausi et al., 2011b). Um beide Fragen zu beantworten wurden die Promotoren der direkten Zielgene von RAP2.2 (Abbildung 19c), *PDC1* und *LBD41*, phylogenetisch und auf molekularer Ebene untersucht.

3.7.1. Identifikation von RAP2.2- und hypoxieresponsiven Promotorregionen

Promotorsequenzen, welche bei der natürlichen Selektion erhalten blieben, beinhalten potenzielle CREs. Um einen ersten Eindruck über die Promotorstrukturen von *PDC1* und *LBD41* zu erhalten, wurden beide nach solchen evolutionär konservierten Regionen innerhalb der Pflanzenfamilie Brassicacea abgesucht. Mithilfe des Programmes Shuffle-LAGAN wurde ein phylogenetisches *shadowing* (Boffelli et al., 2003) durchgeführt. Es wurden paarweise *Alignments* mit stromaufwärts gelegenen Intergensequenzen von *LBD41* und *PDC1* und jeweils denen von putativen orthologen Genen durchgeführt (Abbildung 20; Abbildung 21). Beim *PDC1*-Promotor wiesen die aus *Arabidopsis lyrata* und *Capsella rubella* stammenden Sequenzen insgesamt 6 große Bereiche auf (Bereich 1-6), deren Sequenzähnlichkeiten zu der von *Arabidopsis thaliana* bei über 50% lagen (Abbildung 20). Der hypoxieresponsive Promotorteil *PDC1prom5'-4* überlappte mit 3 dieser Bereiche (Bereich 4-6) vollständig und mit einem Bereich (Bereich 3) partiell (Abbildung 20). Im transienten PTA-System wurde die Aktivität dieser Promotorversion in Anwesenheit von HA:RAP2.2 quantifiziert. Im Vergleich zur Basalaktivität wurde die Aktivität des *PDC1prom5'-4:LUC* Konstruktes etwa 3,5-fach erhöht (Abbildung 20). Die Deletion von zwei konservierten Promotorbereichen (Bereich 3 und 4) durch die Version *PDC1prom5'-5:LUC* und eine weitere Verkürzung (*PDC1prom5'-6:LUC*) resultierten nicht in einer signifikanten Aktivitätsänderung, was darauf hindeutete, dass diese Regionen nicht durch RAP2.2 reguliert werden (Abbildung 20). Im Vergleich dazu führte eine Deletion von 51 bp durch die Version *PDC1prom5'-7:LUC* zur signifikanten Herabsetzung der RAP2.2-induzierten Promotoraktivität auf Basalniveau (Abbildung 20). Da die deletierte Sequenz partiell mit dem kurzen konservierten Bereich 5 überlappte, wurde geschlossen, dass dort ein konserviertes, positiv regulatorisches CRE lokalisiert war, welches direkt oder indirekt durch RAP2.2 aktiviert wurde. Weitere Deletionen, auch im Bereich 6, führten nicht zu einer signifikanten Änderung der *PDC1prom5'-5:LUC*-Aktivität. Es konnte lediglich tendenziell eine weitere, systematische Abnahme der basalen Aktivitäten festgestellt werden (Abbildung 20).

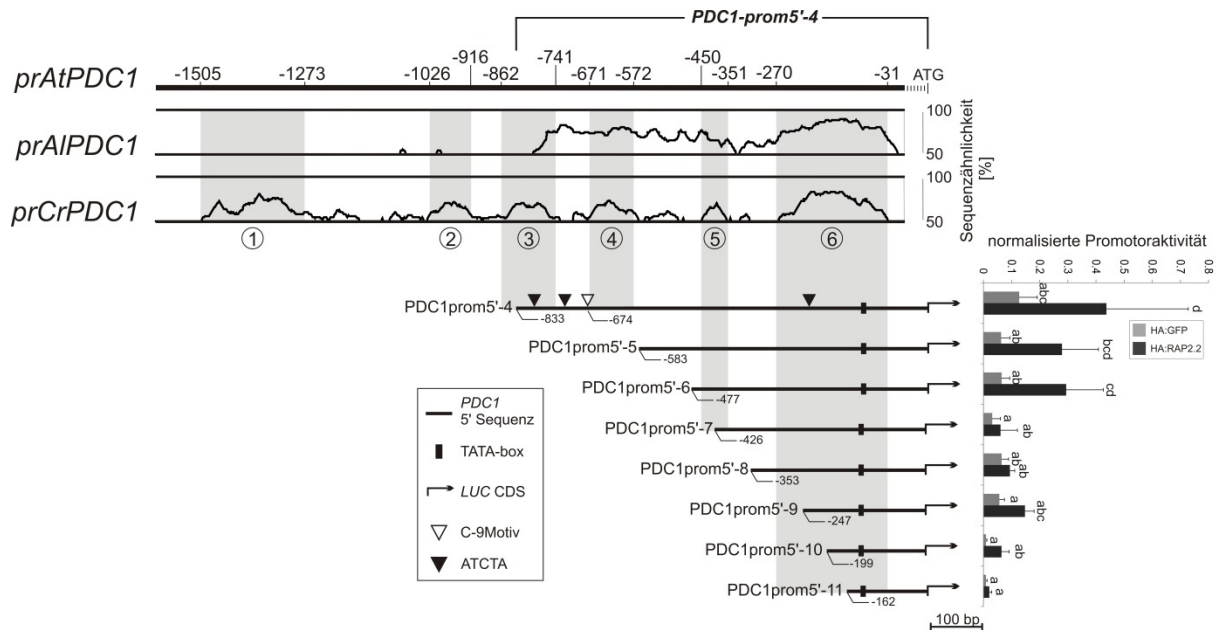


Abbildung 20: Der *PDC1* Promotor beinhaltet eine konservierte, RAP2.2-responsive Region Der Prozent-Identitäts-Plot zeigt paarweise Alignments zwischen der stromaufwärts gelegenen Sequenz der *PDC1* kodierenden Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* und der von putativ orthologen Genen von *PDC1* aus *Arabidopsis lyrata* (*prAlPDC1*) und *Capsella rubella* (*prCrPDC1*). Sequenzähnlichkeiten von > 50 % sind grau markiert. Zahlen sind Distanzen zum ATG. Die Promotorkarte zeigt absolute Längen 5'-deletierter Promotorversionen, ausgehend vom 833 bp-langen *PDC1-prom5'-4*, fusioniert an eine *Firefly Luziferase* (*flLUC*)-kodierenden Sequenz. Positionen von funktionalen cis-Elementen und konservierte Bereiche sind eingezeichnet. Der Graph zeigt basale Promotoraktivitäten in Anwesenheit von HA:GFP und induzierte Aktivitäten in Anwesenheit von HA:RAP2.2, gemessen im normalisierten, transienten, protoplastenbasierten Reportersystem im Col-0 Hintergrund. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 bis 9 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). Normalisierte Promotoraktivität ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids.

Im Gegensatz zur *PDC1* wurde *LBD41* durch RAP2.2 nur primär und nicht zusätzlich sekundär aktiviert (Abbildung 19c). Eine RAP2.2-induzierte Sequenz im *PDC1*-Promotor konnte demnach eine TFBS beinhalten, die nicht durch RAP2.2 oder RAP2.12 gebunden wurde. Im *LBD41*-Promotor waren hingegen direkte Bindestellen zu erwarten (Abbildung 19c). Die Intergensequenz von *LBD41* wies 3 große konservierte Bereiche auf (Bereich 1-3). Um zu testen, ob die ähnlichen Promotorsequenzen von *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* und *Capsella rubella* ähnliche Funktionen besitzen, wurden alle *LBD41*-orthologen Gene auf eine Sauerstoffmangelantwort untersucht. Dazu wurden einzelne Blätter der drei Arten für 2 h in einer belichteten Stickstoffatmosphäre und zum Vergleich unter Umgebungsbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mittels semiquantitativer PCR die relative Transkriptmenge von *LBD41*-orthologen Genen festgestellt (Abbildung 21). Im Vergleich zum geringen Transkriptlevel unter Kontrollbedingungen akkumulierte *LBD41* in

allen drei Arten stark, wenn sie mit Sauerstoffmangel behandelt wurden. Im Vergleich dazu fand für das Referenzgen *EF-1- α* keine differenzielle Genexpression statt, was einen generellen Hypoxieeffekt ausschloss (Abbildung 21). Daraus wurde abgeleitet, dass konservierte Promotorbereiche wahrscheinlich für die hypoxieabhängige Transkriptionsaktivierung verantwortlich waren.

Die hypoxieresponsive Promotorsequenz *LBD41-prom5'-2*, welche die Bereiche 2 und 3 beinhaltete, wurde im nächsten Schritt als Ausgangspunkt für eine detaillierte Deletionsserie genutzt (Abbildung 21). Dazu wurden zunächst 5'-verkürzte Versionen von *LBD41-prom5'-2* (*LBD41-prom5'-3* - 7) an die fLUC-CDS gekoppelt und transient in *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten transformiert. Wie bei der Messung der *PDC1*-Promotoren wurde in den Protoplasten ein posttranslational stabilisiertes HA:RAP2.2-Fusionsprotein überexprimiert. In diesem Experiment stieg die basale Promotoraktivität etwa um den Faktor 14 signifikant an, wenn HA:RAP2.2 überexprimiert wurde (Abbildung 21). Während eine Verkürzung der Promotorsequenz um 69 bp (*LBD41-prom5'-3*) in einem nicht konservierten Bereich keinen signifikanten Einfluss auf dessen Aktivität nahm, führte die Deletion von insgesamt 225 bp, welche partiell mit Bereich 2 überlappten (*LBD41-prom5'-4*), zur signifikanten zweifachen Erniedrigung der durch HA:RAP2.2 bedingten Promotoraktivität (Abbildung 21). Allerdings war tendenziell auch die Basalaktivität dieser Version reduziert, was darauf hindeutete, dass hier eine konstitutiv positiv regulatorische Sequenz gelöscht wurde, welche unabhängig von *group VII*-ERFs funktionierte. Im Vergleich dazu führte die Deletion von weiteren 25 bp (*LBD41-prom5'-5*), und damit dem Hauptteil von Bereich 2, zur signifikanten Reduktion auf weniger als 4 % der ursprünglichen HA:RAP2.2-induzierten Aktivität von *LBD41-prom5'-2* (Abbildung 21). Es wurde angenommen, dass eine positiv regulatorische Sequenz, welche durch RAP2.2 kontrolliert werden konnte, mit den 25 bp überlappte. Weitere 5' Deletionen, auch im Bereich 3, führten nicht zur Reaktivierung des Promotors, was das Vorhandensein einer negativ regulatorischen Region auf der 3' Seite der 25 bp Sequenz als unwahrscheinlich erscheinen ließ. Wie beim *PDC1*-Promotor waren hier lediglich tendenzielle Reduktionen der Promotoraktivitäten erkennbar (Abbildung 21).

Es sollte weiterhin geprüft werden, ob die potenzielle cis-regulatorische Region nicht nur essenziell für die Aktivierung durch HA:RAP2.2 war, sondern auch ausreichend. Zu diesem Zweck wurden vier Versionen des *LBD41-prom5'-4* hergestellt, welche Verkürzungen am 3' Ende aufwiesen. Um den Verlust der nativen TATA-Box, welche essenziell für die Transkriptionsinitiation ist, zu ersetzen, wurde ein künstlicher Minimalpromotor des CaMV 35S-Promotors von 52 bp Länge unmittelbar vor die fLUC-CDS kloniert. Die so entstandenen Versionen *LBD41-prom3'min-1-4* wurden im transienten Protoplasten-transaktivierungssystem auf ihre HA:RAP2.2-Responsivität hin überprüft (Abbildung 21).

Obwohl die positiv regulatorische Sequenz in allen vier Versionen beibehalten wurde, verringerte sich tendenziell die HA:RAP2.2 induzierte Promotoraktivität mit jeder Verkürzung am 3'-Ende. Dies deutete darauf hin, dass die Funktionalität der positiv regulatorischen Region auf einer Kombination mit abwärts gelegenen Sequenzen beruhte. Es war jedoch nicht auszuschließen, dass die Reduktion der Aktivität stattdessen auf dem kürzer werdenden Abstand zum Minimalpromotor basierte. Schließlich reichte ein Triplikат einer 33bp langen Sequenz (3x33bpmin), welche die positiv regulatorische Region beinhaltete, aus, um die HA:RAP2.2 abhängige Reportergenaktivität im Vergleich zum hypoxieresponsiven *LBD41-prom5'-2* signifikant zu erhöhen (Abbildung 21). Daraus wurde geschlossen, dass diese konservierte Region nicht nur essenziell, sondern auch ausreichend für die Transaktivierung durch HA:RAP2.2 war. Außerdem deuteten die Ergebnisse an, dass der Abstand zum Minimalpromotor und die Kopienzahl dieser Sequenz von Bedeutung waren. Aufgrund ihrer Länge wurde sie als 33bp-Region bezeichnet.

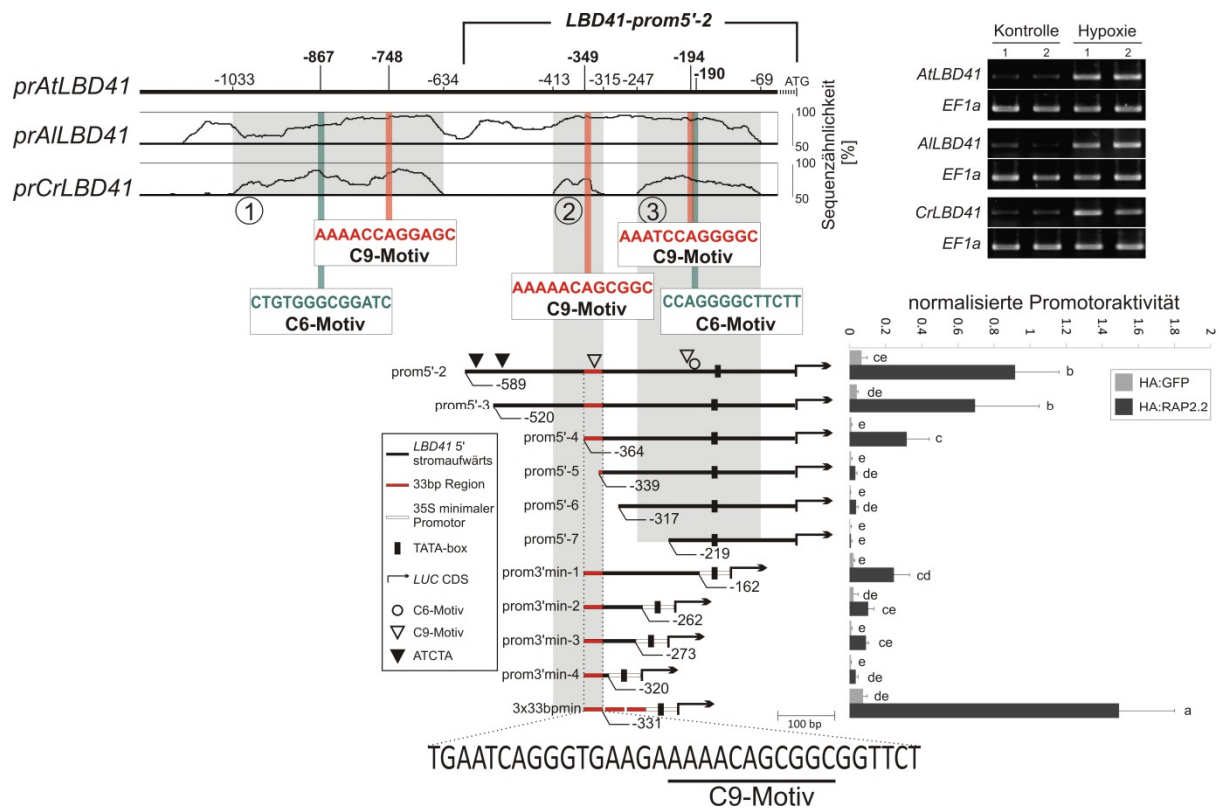


Abbildung 21: Der *LBD41* Promotor beinhaltet eine konservierte, RAP2.2-responsive Region

Der Prozent-Identitäts-Plot zeigt paarweise *Alignments* zwischen der stromaufwärts gelegenen Sequenz der *LBD41*-kodierenden Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* und der von putativ orthologen Genen von *LBD41* aus *Arabidopsis lyrata* (*prAILBD41*) und *Capsella rubella* (*prCrLBD41*). Sequenzähnlichkeiten von > 50 % sind grau markiert. Zahlen sind Distanzen zum ATG. Das Panel zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 3 semiquantitativen PCR-Analysen mit putativen *LBD41*-orthologen Genen aus Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* (*AtLBD41*), *Arabidopsis lyrata* (*AILBD41*) und *Capsella rubella* (*CrLBD41*) unter Kontrollbedingungen (Kontrolle) und nach 2 h Hypoxie. Der *Elongationsfaktor 1 α* (*EF-1-α*) diente als Referenzgen zur Kontrolle der cDNA-Qualität und Quantität. Die Promotorkarte zeigt Längen 5'- und 3' deletierter Promotorversionen, ausgehend vom 589 bp-langen *LBD41-prom5'-2*, fusioniert an eine *Firefly Luziferase* (*fLUC*)-kodierenden Sequenz. Positionen von funktionalen und potenziellen cis-Elementen, sowie konservierte Bereiche sind eingezeichnet. Der Graph zeigt basale Promotoraktivitäten in Anwesenheit von HA:GFP und induzierte Aktivitäten in Anwesenheit von HA:RAP2.2, gemessen im normalisierten, transienten, protoplastenbasierten Reportersystem im Col-0 Hintergrund. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 bis 8 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). Normalisierte Promotoraktivität ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass andere konservierte Promotorbereiche als die 33bp Region für die hypoxiebedingte Aktivierung von *LBD41* und *LBD41prom5'-2* essenziell waren, wurde die Sauerstoffmangelantwort des *3x33bpmin:LUC* Reporters *in planta* getestet. 21 d-alte Individuen von zwei unabhängigen homozygoten Reporterlinien wurden für 9 h unter Belichtung in einer hypoxischen Atmosphäre inkubiert (Abbildung 22). Es zeigte sich

bei diesen Pflanzen eine deutliche Lumineszenz, welche bei unter Kontrollbedingungen inkubierten Individuen abwesend war (Abbildung 22). Der Wildtyp Col-0 lumineszierte hingegen unter keinen Umständen, was zeigte, dass es sich bei der Lumineszenz um ein Reportersignal handelte und nicht um ein experimentelles Artefakt (Abbildung 22). Aus den Daten konnte geschlossen werden, dass die 33bp-Region für eine hypoxiebedingte Genaktivierung ausreichte und möglicherweise aus diesem Grund evolutionsbedingt in Brassicaceae-Genomen erhalten blieb.

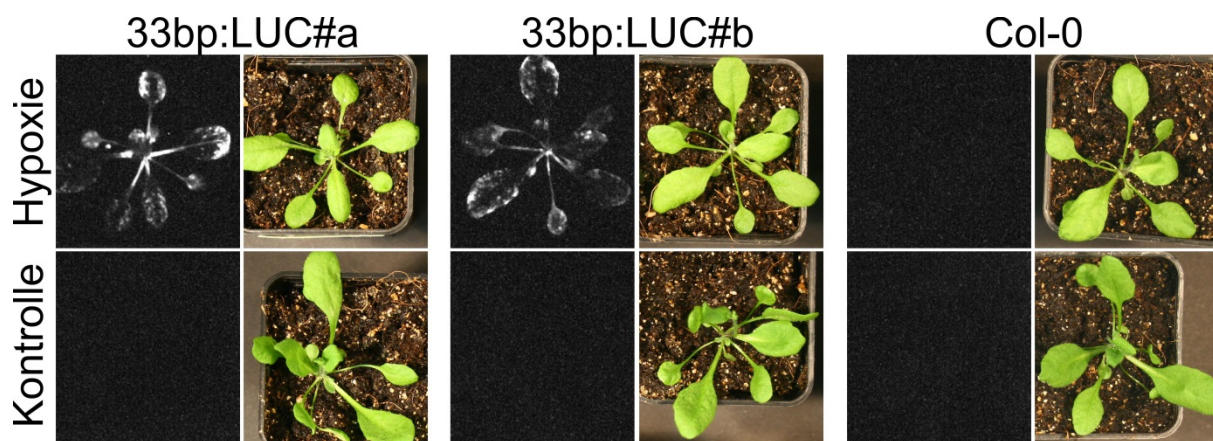


Abbildung 22: Die 33bp Region ist hypoxieresponsiv Dargestellt sind zwei unabhängige, 21 d alte, stabile Col-0 Reporterlinien mit einer triplizierten Variante der 33bp Region, fusioniert an einen 35S Minimalpromotor und der kodierenden Sequenz der *Firefly Luziferase (fLUC)* (*33bpmin:LUC*). Nach 9 h Inkubation unter Hypoxie wurde D-Luziferin appliziert und Biolumineszenz wurde mittels CCD-Kamera optisch detektiert. Col-0 diente als Negativkontrolle. LUC Signale waren nur in hypoxiebehandelten Reporterlinien zu sehen.

3.7.2. RAP2.2 und RAP2.12 binden an die 33bp-Region

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde vermutet, dass die Redundanz von RAP2.2 und RAP2.12 auf einer gemeinsamen TFBS beruhte (Abbildung 15). Da bereits RAP2.2 in der Lage war, die hypoxieresponsive 33bp-Region zu aktivieren (Abbildung 21), sollten RAP2.12 und weitere *group VII-ERFs* ebenfalls auf diese Funktion geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Mesophyllprotoplasten von Col-0 mit dem *3x33bpmin:LUC* Reporter bzw. dem *LBD41prom5'-2:LUC* Reporter und jeweils einem *HA:group VII-ERF* Effektor-konstrukt co-transformiert (Abbildung 23a). HRE2 hatte trotz normaler Expression (Abbildung 12) keinen Einfluss auf die Promotoraktivitäten (Abbildung 23a). Im Vergleich dazu war die Reporter-genaktivität von *3x33bpmin:LUC* und *LBD41prom5'-2:LUC* in Anwesenheit der restlichen ERF TFs erhöht. HRE1 konnte die Aktivitäten der Promotoren tendenziell jeweils um den Faktor 6 und 3 steigern. RAP2.3 und CKC/ANT waren in der Lage, die *3x33bpmin* Sequenz tendenziell und die *LBD41prom5'-2* Sequenz signifikant zu

induzieren. Im Vergleich dazu konnten RAP2.2 und RAP2.12 die Basalaktivität beider Promotoren hoch signifikant bis zu 22-fach aktivieren (Abbildung 23a).

Da das Expressionslevel der *group* VII-ERFs im Protoplastensystem nicht mit deren Transaktivierungseigenschaften korrelierte (Abbildung 12; Abbildung 23a) wurde vermutet, dass diese auf Unterschiede in deren Bindungskapazitäten für die 33bp-Region beruhten. Das native *A. thaliana* Protoplastensystem lässt jedoch keine Aussagen zur Protein-DNA-Interaktion von TFs zu, weil auch deren Zielgene für die Promotoraktivierung verantwortlich sein könnten. Um herauszufinden, ob *group* VII-ERFs die 33bp-Region direkt oder indirekt aktivierten, wurde stellvertretend das *(MA)RAP2.2:HBD*-Konstrukt transient in Protoplasten der *3x33bp:LUC#a*-Linie (Abbildung 22) überexprimiert. Nach DEX-Behandlung akkumulierten *LUC*-Transkripte signifikant stärker im Vergleich zu Kontrollbehandlungen (Abbildung 23b). Bedeutsam war, dass die CHX-Behandlung die *LUC*-Transkription nicht negativ beeinflusste, was die additive Wirkung eines möglichen RAP2.2-induzierten Faktors als unwahrscheinlich erscheinen ließ (Abbildung 23b). Diese Daten könnten durch eine direkte Bindung zwischen RAP2.2 und der 33bp-Region erklärt werden.

Um diesen Sachverhalt genauer zu prüfen, wurde die Bindung der fünf Mitglieder der *group* VII-ERF Familie und CKC/ANT an die 33bp-Region in einem heterologen H1H-System geprüft, in welchem pflanzenspezifische Transkriptionsfaktorkaskaden nicht existieren (Abbildung 23c). Zunächst wurde ein stabiler *3x33bp:HIS3*-Reporterstamm generiert, welcher als Doppelpositivkontrolle zusätzlich ein *3x33bp:LacZ*-Konstrukt mit URA-Marker enthielt. Das *HIS3*-Reportergen zeigte unter Histidinmangelbedingungen eine Autoaktivierung, welche essenziell für die initiale Selektion von positiven Transformanten war (Abbildung 23c). Dieses Signal konnte einerseits durch die konstitutive Basalaktivität des Minimalpromotors erklärt werden, zum anderen konnte eine unspezifische DNA-Bindung von Hefe-TFs an die 33bp-Region als Ursache infrage kommen. Um das Hintergrundsignal zu minimieren, wurden 40 mM des kompetitiven Inhibitors des *HIS3*-Genproduktes, 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazol (3AT), eingesetzt. Die *HIS3*-Autoaktivität wurde nicht in Abwesenheit von Trp im Medium beobachtet (Abbildung 23c, Wasserkontrolle). Die transiente Transformation des *trp*-Marker enthaltenden Beutevektors pDEST_AD rekonstituierte das Hefewachstum auf Mangelmedium (–his-trp-ura), wodurch unter 3AT-freien Bedingungen die Transformationseffizienz kontrolliert werden konnte. Dabei fiel auf, dass die Transformation des AD:RAP2.3-Konstruktes, im Vergleich zu anderen AD:*group* VII-ERF Fusionen, zu einem schwächeren Hefewachstum führte (Abbildung 23c). Da dieses Phänomen ebenso für das sehr ähnliche Protein CKC/ANT bei mehreren biologischen Replikaten, in unabhängigen Reporterstämmen (Abbildung 23c; Abbildung 30a) und trotz gleicher Plasmidkonzentrationen beobachtet wurde, wurde ein Transformationsfehler ausgeschlossen. Aufgrund dieses

Problems konnte mit dem HIS-Reporter keine Aussage über die Bindung von AD:RAP2.3 und AD:CKC/ANT an die 33bp Region getroffen werden.

Die Expression der AD-Domäne alleine führte in Anwesenheit von 40 mM 3AT nicht zur verstärkten Induktion des HIS3-Gens, was einen möglichen Nebeneffekt der AD-Domäne ausschloss (Abbildung 23c). Das gleiche Ergebnis wurde für N-Terminale AD-Fusionen an HRE1 und HRE2 erzielt, was darauf hindeutete, dass diese TFs nicht mit der 33bp-Region interagierten. Im Vergleich dazu waren sowohl AD:RAP2.2 als auch AD:RAP2.12 in der Lage, die inhibitorische Wirkung des 3AT durch verstärkte HIS3-Transkription auszugleichen, was bei stärkeren Hefeverdünnungen besonders deutlich zu sehen war (Abbildung 23c). Diese Bindungseigenschaften waren spezifisch für die 33bp-Region, da der Sequenzfremde Kontrollpromotor *promB0507.1* aus *Caenorhabditis elegans* zwar durch den *Caenorhabditis elegans* Snail-type TF (CES-1), aber durch keinen der *A. thaliana* group VII-ERFs aktiviert wurde (Abbildung 24). Bestätigt wurde die Bindung durch den LacZ-Reporter, welcher ebenfalls unter der Kontrolle der 3x33bp-Region stand. Bei diesem Test zeigte sich nur in Anwesenheit von AD:RAP2.2, AD:RAP2.12 und auch von AD:RAP2.3 und AD:CKC/ANT eine verstärkte LacZ-Expression, was für die AD alleine sowie AD:HRE1 und AD:HRE2 nicht beobachtet wurde (Abbildung 23c). Im CES-1-Kontrollsystem versagte hingegen der LacZ Test, was vermutlich in einem Integrationsfehler des Reporters begründet lag (Abbildung 24). Die Ergebnisse sind starke Indizien dafür, dass sich RAP2.2, RAP2.12 und wahrscheinlich auch RAP2.3 und CKC/ANT eine TFBS auf der Sequenz der 33bp-Region teilten, um *LBD41* transkriptionell zu aktivieren.

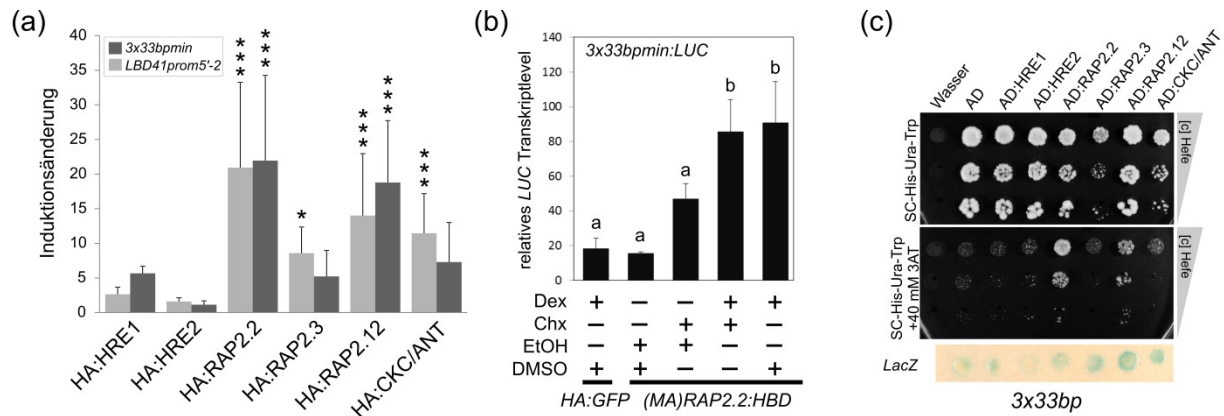


Abbildung 23: Konstitutive *group* VII-ERFs interagieren direkt mit der 33bp-Region. (a) Normalisierte Transaktivitätsmessung von Hämagglutinin (HA)-markierten *group* VII-ERFs am *LBD41prom5'-2* und einer triplizierten Version der 33bp-Region mit 35S-Minimalpromotor (3x33bpmin) im transienten, protoplastenbasierten Luziferase-Reportersystem, im genetischen Hintergrund des Col-0 Wildtyps. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von je 6 Replikaten. * kennzeichnet signifikanten Unterschied zur HA:GFP-Effektorkontrolle des jeweiligen Promotors mit $p < 0.05$ und *** mit $p < 0.001$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). Induktionsänderung sind fLUC/rLUC-Verhältnisse normalisiert auf die HA:GFP-Effektorkontrolle. fLUC/rLUC ist das Verhältnis zwischen Firefly-Luziferase im Reportervektor und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase eines Kontrollplasmids. (b) qRT-PCR-Quantifizierung des *LUC*-Transkriptes aus Protoplasten einer 3x33bpmin:*LUC*-Reporterlinie (Abbildung 22) im Col-0 Hintergrund, welche transient entweder HA:GFP oder (MA)RAP2.2:HBD exprimierten. CHX und DMSO wurden 30 min vor DEX und EtOH appliziert und Protoplasten wurden für weitere 4 h unter Langtagbedingungen inkubiert. Relative Transkriptlevel wurden auf den *Elongationsfaktor 1 α* (*EF-1 α*) normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0.05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test). (c) Hefe-1-Hybrid (H1H)-Assay mit stabilem 3x33bp:HIS/3x33bp:LacZ Hefestamm mit transienter Expression von Aktivierungsdomäne (AD):*group* VII-ERF-Fusionen. Wasser und AD-kodierender Vektor dienten als Negativkontrollen. Das Panel zeigt gleich verdünnte Hefetransformanten nach 5 d Wachstum auf Selektionsmedium in Ab- und Anwesenheit des HIS3-Inhibitors 3-Aminotriazol (3AT). Blaue Punkte repräsentieren β -Galactosidase- Aktivität als Doppelpositiv-Kontrolle.

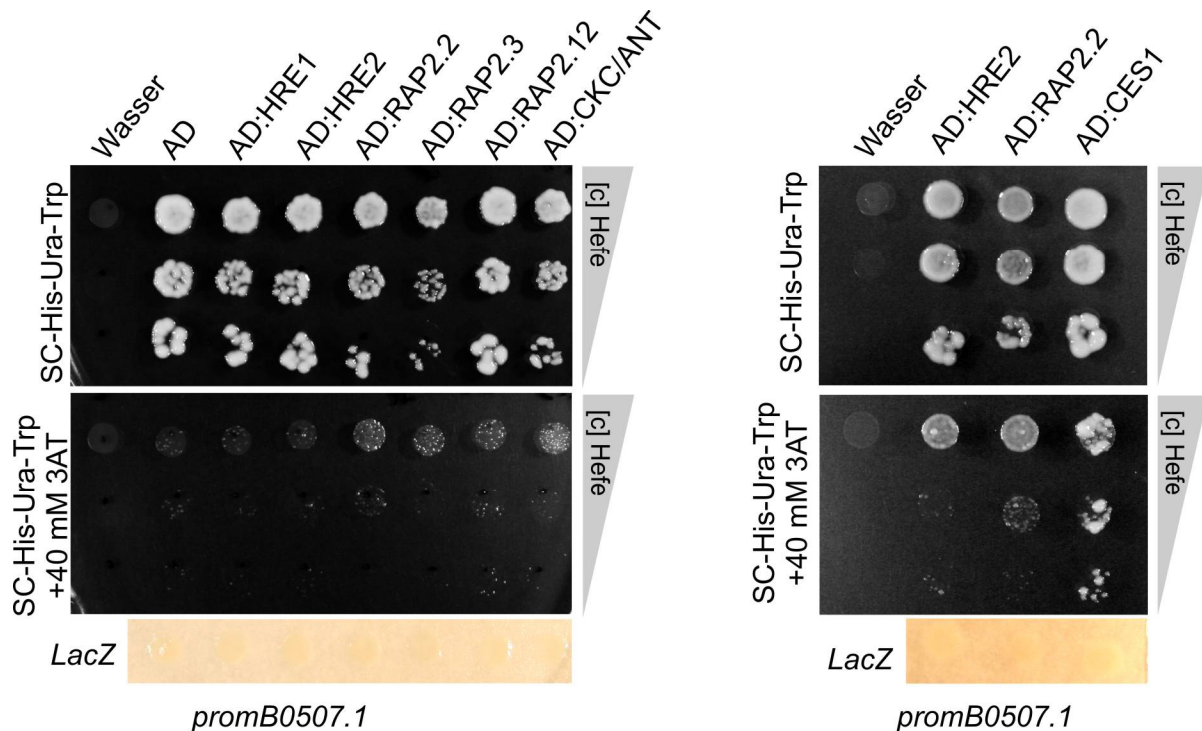


Abbildung 24: *group VII*-ERFs aktivieren keine unspezifischen Hefe-1-Hybrid Reporter Hefe-1-Hybrid (H1H)-Assay mit stabilem promB0507:HIS/promB0507:LacZ Hefestamm mit transienter Expression von Aktivierungsdomäne (AD):*group VII*-ERF Fusionen. Wasser und AD-kodierender Vektor dienten als Negativkontrollen. AD:CES-1 (Reece-Hoyes et al., 2009) diente als Positivkontrolle. Panele zeigen gleich verdünnte Hefetransformanten nach 5 d Wachstum auf Selektionsmedium in Ab- und Anwesenheit des HIS3- Inhibitors 3-Aminotriazol (3AT). *β-Galactosidase*- Aktivität war nicht messbar.

3.7.3. Musterabgleich und klassische Mustererkennung innerhalb der 33bp-Region

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen wurde vermutet, dass die 33bp-Region des *LBD41*-Promotors eine TFBS besitzt. Um Hinweise für die Existenz eines bereits bekannten CREs innerhalb dieser Sequenz zu erhalten, wurde zunächst ein Musterabgleich durchgeführt. Dabei wurde mithilfe des RSA-tools „DNA-pattern“ nach Motiven gesucht, die bereits mit der Hypoxieantwort oder der *group* VII-ERF-abhängigen Genregulation in Verbindung gebracht wurden (Walker et al., 1987; Dolferus et al., 1994; Büttner und Singh, 1997; Geffers et al., 2000; Geffers et al., 2001; Klok et al., 2002; Liu et al., 2005; Mohanty et al., 2005; Welsch et al., 2007; Yang et al., 2009; Hsu et al., 2011; Licausi et al., 2011c; Mohanty et al., 2012; Wu et al., 2014). Zwei Motive (TTTTCTTC und TTTTCT), welche von Mohanty et al. 2005 gefunden wurden, zeigten Ähnlichkeiten mit Teilsequenzen der 33bp-Region. Jedoch wurden beide der lichtabhängigen Genregulation zugeordnet, was deren Relevanz für die hypoxieabhängige Genregulation infrage stellte (Mohanty et al., 2005).

Um nach dem Vorkommen von noch unbekannten Motiven zu suchen, welche sich in hypoxieresponsiven Promotoren und in der 33bp Region befanden, wurden drei

Mustererkennungsalgorithmen MEME (Bailey und Elkan, 1994), Gibbs sampler (Lawrence et al., 1993) und Consensus (Stormo und Hartzell, 1989) auf die aufwärts gelegenen Bereiche der 49 „core“ hypoxieresponsiven Gene (Mustroph et al., 2009) angewandt. Trotz wiederholter Suche bei veränderten Parametern fand sich kein Motiv, das von allen drei Algorithmen vorhergesagt werden konnte und Ähnlichkeiten zur 33bp-Region aufwies. Dies ließ vermuten, dass die gesuchte TFBS entweder eine kryptische Sequenz aufwies oder in einem kleineren Set an hypoxieresponsiven Genen relativ stark angereichert war, was die Vorhersage erschweren könnte.

3.7.4. Die 33bp-Region enthält ein evolutionär konserviertes Motiv

Beim phylogenetischen *shadowing* (Abbildung 20; Abbildung 21) werden nicht kodierende Sequenzen von mehreren nahe verwandten Arten verglichen, um homologe Motive herauszufiltern (Boffelli et al., 2003). Die nahe Verwandtschaft gewährleistet zwar oft eine konservierte Position der Motive, was deren Identifikation erleichtert. Jedoch kann dies zu einer verminderten Auflösung bei der Motivvorhersage führen, besonders wenn wenige Arten einbezogen werden (Abbildung 20; Abbildung 21). Um ein klar abgegrenztes Motiv innerhalb der konservierten 33bp-Region zu finden, wurde ein phylogenetisches *Footprinting* mit entfernt verwandten Arten durchgeführt (Gumucio et al., 1992). Um dabei die Detektionsrate von falsch-positiven und Hypoxie-irrelevanten Motiven zu minimieren, wurde eine Strategie namens „vergleichendes phylogenetisches *Footprinting*“ entwickelt. Hierbei wurde statt nur eines Gens ein co-reguliertes Set an 49 hypoxieresponsiven Genen nach konservierten Promotorbereichen abgesucht. Die so vorhergesagten Motive wurden anschließend in einer Clusteranalyse nach Ähnlichkeiten gruppiert (Abbildung 25). Zum Vergleich und zur Überprüfung des Vorhersageerfolges des vergleichenden phylogenetischen *Footprintings* wurden zudem 49 Gene untersucht, welche bei Phosphatmangel transkriptionell aktiviert werden (Bustos et al., 2010); WT Shoot-Pi - WT Shoot+Pi). Mindestens für eine Untergruppe dieser Gene sollte sich im Promotorbereich die bekannte *PHR1 Binding Site* (P1BS) mit der Konsensussequenz GNATATNC vorhersagen lassen (Rubio et al., 2001).

Zunächst wurden 1 kB aufwärts gelegene Intergensequenzen von putativ orthologen Genen aus der PLAZA Datenbank (Proost et al., 2009) extrahiert. Mittels des Mustererkennungsprogrammes MEME wurden je orthologem Genset drei potenziell konservierte Motive gefunden. Jedes Motiv wurde nach dem jeweiligen *Arabidopsis* AGI-Code und den Buchstaben A-C benannt (Abbildung 25; Abbildung 26). Um die so ermittelten 147 potenziell konservierten Bereiche nach Ähnlichkeiten zu ordnen, wurde das internetbasierte Motiv-Cluster Programm STAMP benutzt (Mahony und Benos, 2007). Ein Cluster wurde definiert als Gruppe von mindestens 5 Motiven, welche im phylogenetischen Baum eine Kantenlänge von kleiner als 0.01 zum gemeinsamen Knoten aufwiesen, was eine

sehr starke Ähnlichkeit repräsentierte. Alle vorhergesagten Sequenzen innerhalb eines Clusters wurden daher zu einer Konsensussequenz zusammengefasst und als einzelnes Motiv betrachtet (Abbildung 25; Abbildung 26).

Für die 49 Hypoxiemarkergene wurden neun Cluster gefunden (Abbildung 26). Drei von diesen zeigten Konsensussequenzen mit geringer Komplexität (Cluster 1, 3, 8), was bei der Vorhersage von promotorlokalisierten CREs häufig auftritt (Abbildung 26). Die gleichen Sequenzen wurden auch in drei von sieben Clustern der Phosphatmangelgruppe gefunden (Cluster 2, 5, 6), was zeigt, dass sie keine spezifischen Rollen für die hypoxiebedingte Genregulation zu spielen scheinen (Abbildung 25). Die Sequenzen aller Motive wurden in PSSMs übersetzt und zur Suche nach Ähnlichkeiten zu bereits veröffentlichten CREs eingesetzt. Hierzu wurde die Funktion von STAMP benutzt, um einen Musterabgleich mit den drei Datenbanken PLACE, Agris, Athamap (Higo et al., 1999; Davuluri et al., 2003; Steffens et al., 2004) durchzuführen. Wenn mindestens zwei Datenbankeinträge mit einer hohen Signifikanz von $<1e-05$ (E-value) mit einem der vorhergesagten Motive übereinstimmten, galt dieses Motiv als bekannt (Tabelle A 1). Von sieben Clustern der Phosphatmangelgruppe wurde eines (Cluster 7) von AthaMap als Myb-TFBS erkannt und von PLACE eindeutig als P1BS identifiziert (Abbildung 25, Tabelle A 1). Dadurch wurde gezeigt, dass das vergleichende phylogenetische *Footprinting* verlässliche Vorhersagen treffen konnte.

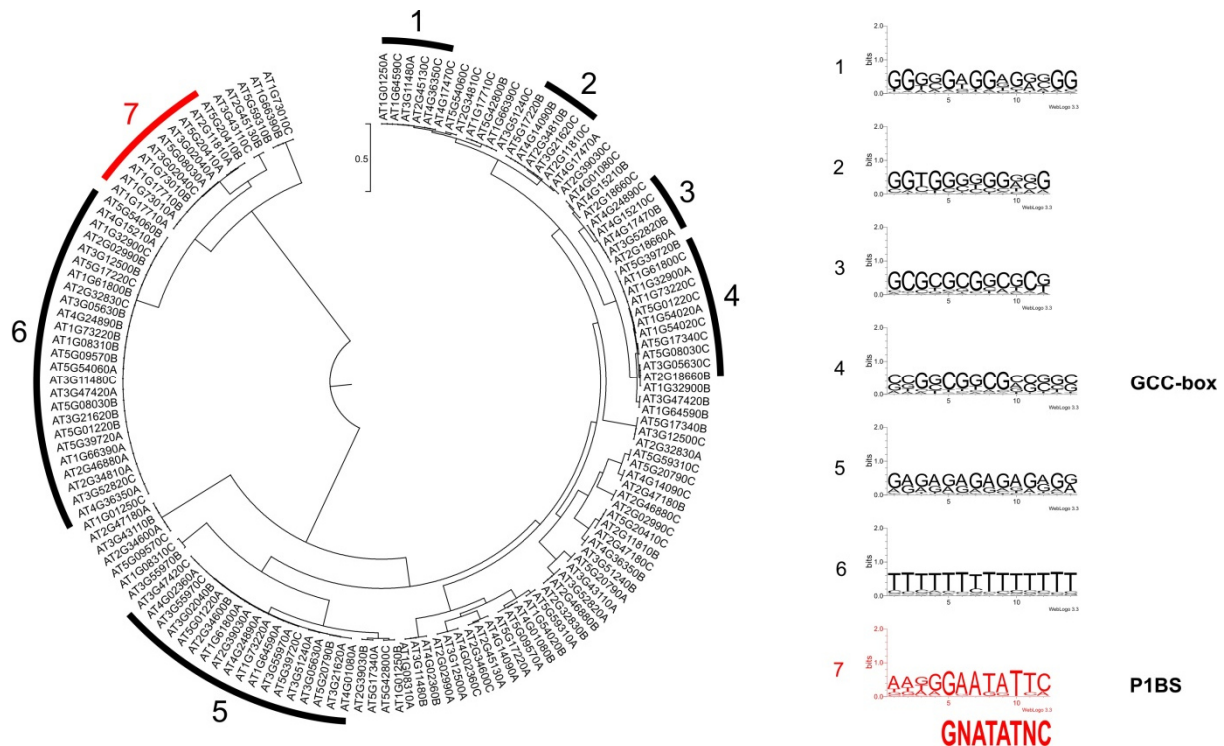


Abbildung 25: Vergleichendes phylogenetisches Footprinting detektiert bekannte cis-regulatorische Elemente Der Baum zeigt drei phylogenetische *Footprints* pro Promotor von insgesamt 49 stark phosphatmagelresponsiven Genen im *Arabidopsis thaliana* Spross (Bustos et al., 2010), nach Ähnlichkeit in sieben Cluster gruppiert. Ein Cluster wurde als Gruppe von mindestens 5 Motiven definiert, welche zum gemeinsamen Knoten eine Kantenlänge von weniger als 0.01 aufwiesen und somit eine Konsensussequenz repräsentierten. Clusterspezifische Konsensussequenzen sind als Sequenzlogos dargestellt und, sofern bekannt, bezeichnet. Cluster 7 repräsentiert die phosphatmangelresponsive PHR1-Bindestelle (P1BS) (Rubio et al., 2001).

In der Sauerstoffmangelgruppe befanden sich drei unbekannte Cluster (5, 6 und 9), während Cluster 2, 4 und 7 mit Datenbankeinträgen übereinstimmten (Abbildung 26, Tabelle A 1). Cluster 2 (C2-Motiv) wies starke Ähnlichkeiten zum IBox-Promotormotiv auf, welches in lichtregulierten Promotoren zu finden ist (Giuliano et al., 1988). Das C7-Motiv beinhaltet das *Abscisic Acid Responsive Element* (ABRE) (Marcotte et al., 1989; Mundy et al., 1990), was auf ein Mitwirken von bZIP TFs in der Sauerstoffmangelantwort hindeutete. Cluster 4 wurde als *GCC-core* Element identifiziert, das eine prominente Bindestelle für ERF-TFs und potenziell für *group* VII-ERFs darstellte (Abbildung 26, Tabelle A 1). Für das C5-Motiv fand sich kein bekanntes Muster in den Datenbanken und es war durch eine kryptische Sequenz charakterisiert (CCANCGNC(G/A)GG). Das C6-Motiv bestand aus einer unbekannten, stark konservierten GGCG-Kernsequenz und weniger konservierten, kryptischen flankierenden Sequenzen (Abbildung 26, Tabelle A 1). Das C9-Motiv stellte eine partiell kryptische Sequenz dar (AAAACCA(G/C)(G/C)(G/C)GC), welche zum einen durch einen stark konservierten AC-reichen Bereich gekennzeichnet war, welcher von PLACE als potenzielle

MYB-TFBS identifiziert wurde (Abbildung 26, Tabelle A 1). Zum anderen bestand es aus einem unbekannten GC-reichen Bereich, welcher aus einem weniger konservierten Teil und einem terminalen, stark konservierten GC Paar bestand (Abbildung 26). Obwohl das C9-Motiv als Ganzes in keiner Datenbank gefunden wurde (Tabelle A 1), zeigte es starke Ähnlichkeit zur Subregion II des *Anaerobic Responsive Elements* (ARE) der *ADH1* aus Mais (Walker et al., 1987).

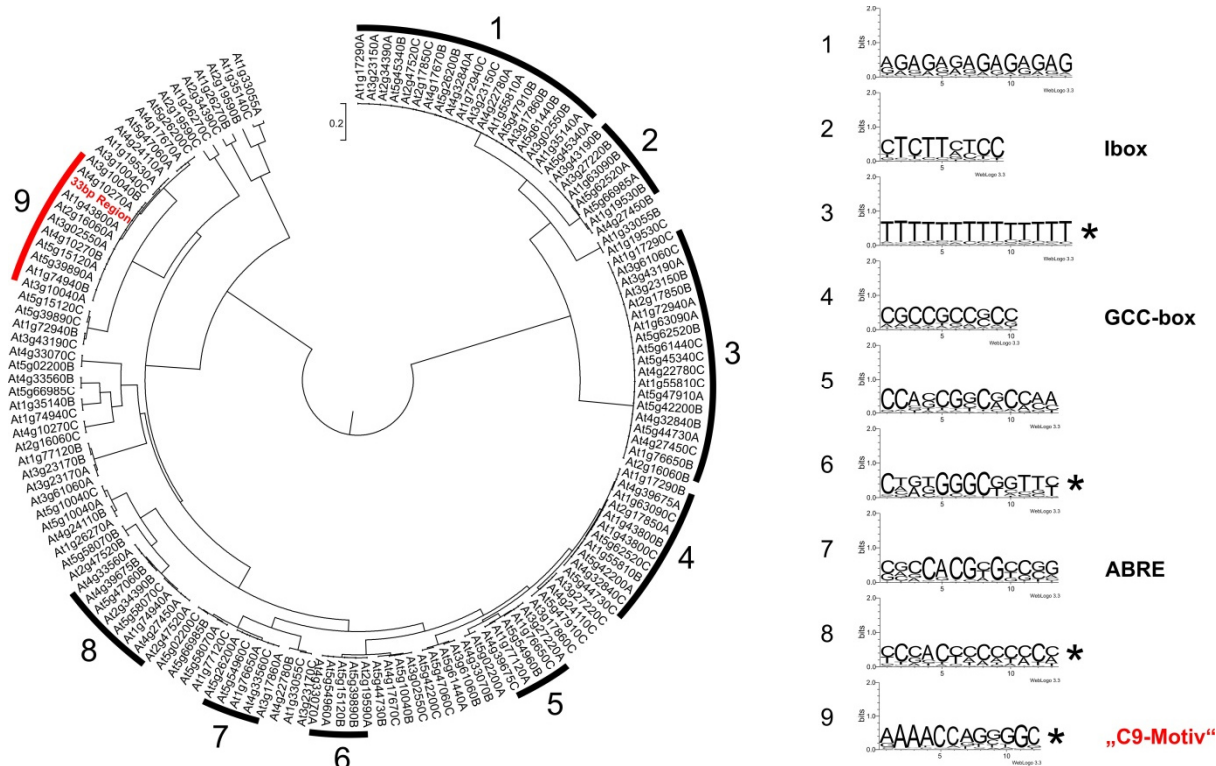


Abbildung 26: Hypoxiegene der core-Antwort teilen sich konservierte cis-regulatorische Promotorelemente Der Baum zeigt drei phylogenetische *Footprints* pro Promotor von 49 Hypoxiecore Genen in *Arabidopsis thaliana* (Mustroph et al., 2009), nach Ähnlichkeit in neun Cluster gruppiert. Ein Cluster wurde als Gruppe von mindestens 5 Motiven definiert, welche zum gemeinsamen Knoten eine Kantenlänge von weniger als 0.01 aufwiesen und somit eine Konsensussequenz repräsentierten. Die 33bp-Region wurde in das *Clustering* eingeschlossen. Clusterspezifische Konsensussequenzen sind als Sequenzlogos dargestellt und, sofern bekannt, bezeichnet. Cluster 9 wurde in dieser Arbeit als C9-Motiv bezeichnet. Sternchen markieren signifikante Anreicherung eines Cluster-Motivs innerhalb der Promotoren von 49 Hypoxiecore Genen, im Vergleich zum Gesamtgenom (Hypergeometrische Verteilung, Bonnferroni korrigiert ($p < 10^{-4}$); Tabelle A 2).

Clusterspezifische Motive traten möglicherweise in mehr Genen auf, als im jeweiligen Cluster gelistet waren. Um die exakte Anzahl und Position der vorhergesagten PSSMs innerhalb der stromaufwärts gelegenen Sequenzen der 49 core hypoxieresponsiven Gene zu finden, wurde das RSA-Tool „matrix-scan“ benutzt. Es wurden hypergeometrische Tests angewandt

um herauszufinden, ob die putativen CREs innerhalb der 49 *core* Gene im Vergleich zum *Arabidopsis thaliana*-Genom angereichert waren. Von insgesamt 4 Motiven (Cluster 3, 6, 8 und 9), welche signifikant angereichert waren ($p < 10^{-4}$, Bonferroni korrigiert), besaß das Motiv aus Cluster 9 den niedrigsten p-Wert ($p = 1.52 \cdot 10^{-16}$) (Abbildung 26, Tabelle A 2). Darüber hinaus waren die Motive von Cluster 6 und 9 präferenziell nahe dem Startcodon angereichert (Abbildung 27, Tabelle A 2). Für beide war die Akkumulation an Position -100 bis -200 bp, relativ zum ATG, signifikant, was auf eine konservierte Position hinwies.

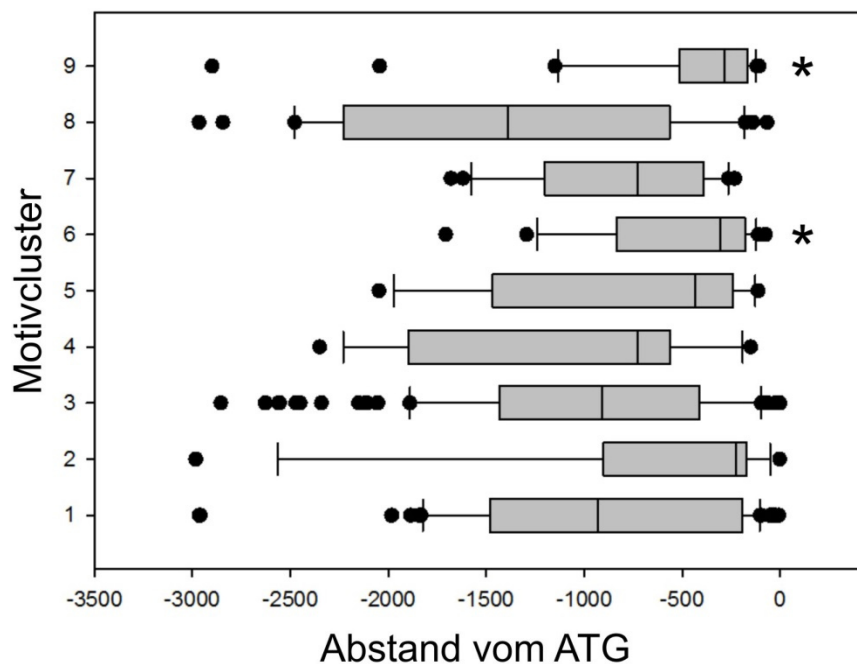


Abbildung 27: Das C9-Motiv besitzt eine signifikante Positionspräferenz Box-Plot zeigt Verteilung von Cluster-spezifischen PSSMs (Motivcluster) innerhalb aller Promotoren der 49 Hypoxie *core* Gene (*sig value* > 4.5). Sternchen markieren Motive mit signifikanter Anreicherung innerhalb eines von 30 100 bp-Segmenten, im Vergleich zur Maximalpromotorlänge von 3000 bp (Hypergeometrische Verteilung, Bonferroni korrigiert ($p < 10^{-4}$)).

Um herauszufinden, welches der Cluster eine potenzielle TFBS innerhalb der 33bp Region darstellte, wurde letztere in den Sequenzvergleich mit einbezogen, was ihre Ähnlichkeit zum C9-Motiv enthüllte (Abbildung 26). Tatsächlich wies die Konsensussequenz von Cluster 9 (AAAACCA(G/C)(G/C)(G/C)GC) mehr als 90 % Ähnlichkeit zum 3' Abschnitt der 33bp Region (AAAAACAGCGGC) auf. Die aufwärts gelegene Sequenz von *LBD41* enthielt drei C9-Motive (Abbildung 21). Jene Version, welche am weitesten vom Startcodon entfernt lag (AAAACCAGGAGC; -737bp), war identisch mit dem konservierten Motiv At3g02550A, welches in Cluster 9 auftauchte (Abbildung 21; Abbildung 26). Das mittig gelegene C9-Motiv konnte als Teilsequenz der 33bp-Region identifiziert werden (AAAAACAGCGGC; -338bp)

was die Zugehörigkeit der 33bp-Region zum Cluster 9 untermauerte. Eine weitere Version tauchte schließlich stromabwärts der 33bp-Region auf (AAATCCAGGGGC; -183bp) (Abbildung 21). Es ist hervorzuheben, dass alle im *LBD41*-Promotor gefundenen C9-Motive im Brassicaceagenom konserviert waren, obwohl nicht alle im Cluster 9 auftauchten (Abbildung 21; Abbildung 26). Die Ergebnisse zeigten, dass das C9-Motiv eine partiell kryptische Sequenz mit der Länge einer typischen TFBS darstellte, welche in der 33bp Region und anderen hypoxieresponsiven Promotoren konserviert vorlag.

3.7.5. Das konservierte C9-Motiv ist entscheidend für die RAP2.2 und RAP2.12 induzierte Promotoraktivierung

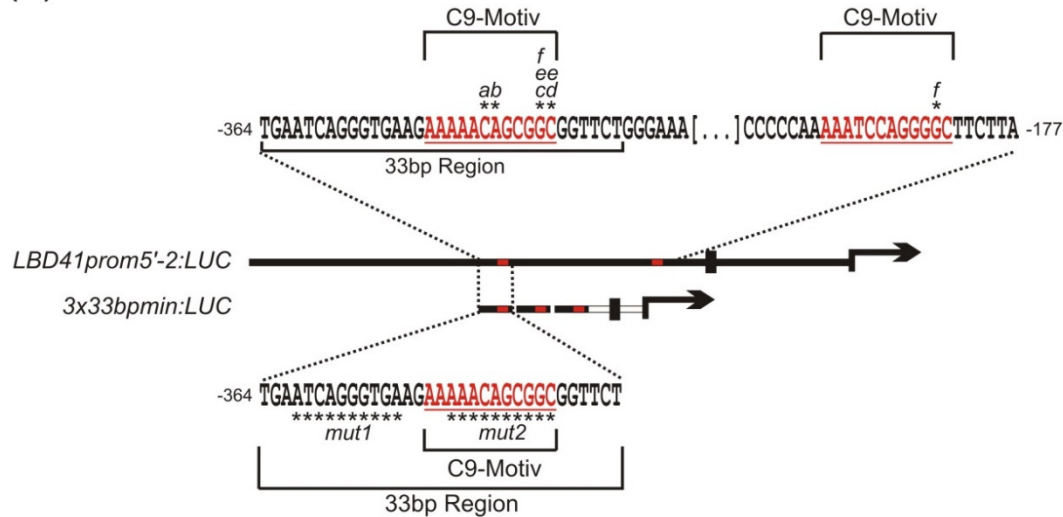
Group VII-ERFs können eine sehr schnelle transkriptionelle Antwort hervorrufen, da sie konstitutiv transkribiert und unter Sauerstoffmangel durch einen gestörten NERP post-translational stabilisiert werden (Licausi et al., 2011b; Kosmacz et al., 2014). Aus diesem Grund sollten Gene, welche die TFBS für RAP2.2 und RAP2.12 in ihren Promotoren besitzen, in NERP-Mutanten konstant hochreguliert sein. Darüber hinaus ist zu erwarten, dass diese Gene, als primäre *group VII*-ERF Zielgene, schneller auf Sauerstoffmangel reagieren als sekundäre Zielgene, da für letztere ein weiterer Faktor zeitaufwendig translatiert werden müsste. Im Vergleich zu solchen *core* Genen, welche Clustermotive 1-8 in ihren Promotoren trugen, waren C9-Motiv tragende Gene am stärksten unter frühen NERP-Zielgenen angereichert (Tabelle A 3; van Dongen et al., 2009; Mustroph et al., 2009; Gibbs et al., 2011). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass RAP2.2 und RAP2.12 an die C9-Motiv enthaltende 33bp-Region banden, ließen diese Daten vermuten, dass das C9-Motiv für diese TFs eine essenzielle TFBS darstellte.

Um die Relevanz des C9-Motivs zu testen, wurden zunächst 10 bp innerhalb dieses Motivs im *3x33bpmin:LUC* Konstrukt substituiert, wodurch sowohl die AC- als auch die GC-reiche Region zerstört wurde (*3x33bpmin_mut2*) (Abbildung 28a). Dadurch wurde im Protoplastensystem die Tansaktivierung durch HA:RAP2.2, im Vergleich zum nicht mutierten Concatemer, um etwa 90 % reduziert (Abbildung 28b). Dieser starke Effekt war spezifisch für Mutationen des C9-Motivs, da durch die Substitution einer benachbarten Sequenz (*3x33bpmin_mut1*) kein signifikanter Unterschied zur wildtypischen 33bp-Region gemessen wurde (Abbildung 28b). Das C9-Motiv tauchte häufig in revers- komplementärer Orientierung in hypoxieresponsiven Promotoren auf. Daher wurde auch die Funktion einer solchen Version des *3x33bpmin_mut1* (*3x33bpmin_mut1 revers*) getestet. Diese Version wurde durch HA:RAP2.2 ebenso stark induziert wie die Wildtypversion oder *3x33bpmin_mut1* (Abbildung 28b).

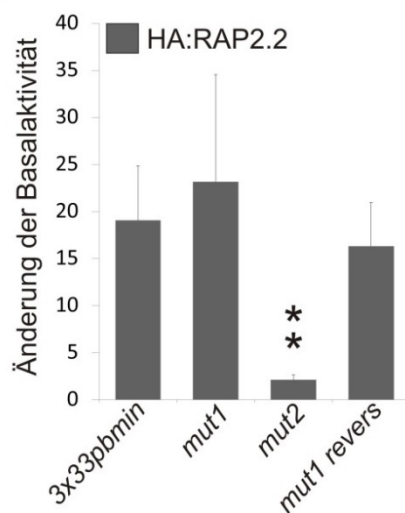
Die Multimerisierung von Promotorsequenzen kann experimentelle Artefakte hervorrufen, welche auf der zufälligen Modulation oder Entstehung einer TFBS beruhen können. Es

wurde deshalb geprüft, ob das C9-Motiv auch in der nativen *LBD41prom5'-2*-Sequenz essenziell war (Abbildung 28a,c). Diese Promotorversion enthielt zwei C9-Motive, von welchen das distal gelegene innerhalb der 33bp-Region lokalisiert war (Abbildung 21; Abbildung 28a). Durch *site directed mutagenesis* wurden zunächst in diesem Motiv jeweils vier Substitutionen einzelner stark konservierter Nukleotide im AC- und GC- reichen Teil und eine Doppelsubstitution des terminalen GC-Paars durchgeführt (Abbildung 28a). Bis auf eine Promotorvariante mit einem Basenaustausch im AC-reichen Teil (*LBD41prom5'-2_b*), welche eine wildtypische Aktivierung durch HA:RAP2.2 zeigte, besaßen alle Varianten eine tendenziell bzw. signifikant reduzierte Induktion bis zu einem Minimum von etwa 33 % (Abbildung 28c). Dies zeigte, dass sowohl die AC-reiche als auch die GC-reiche Region wichtig für die RAP2.2-vermittelte Aktivierung waren. Der stärkste Aktivitätsrückgang wurde durch kombinierte Substitutionen des terminalen Guanins in beiden C9-Motiven ausgelöst (Abbildung 28c). Beide Versionen des vorhergesagten Motivs konnten demnach die *group VII-ERF*-abhängige, transkriptionelle Aktivierung von *LBD41* positiv beeinflussen.

(a)



(b)



(c)

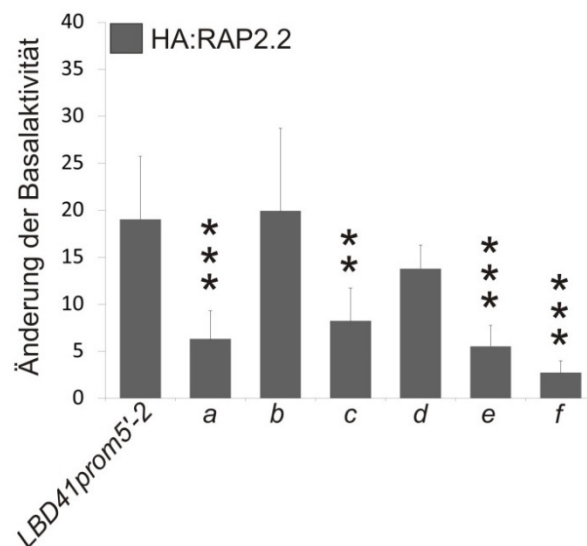
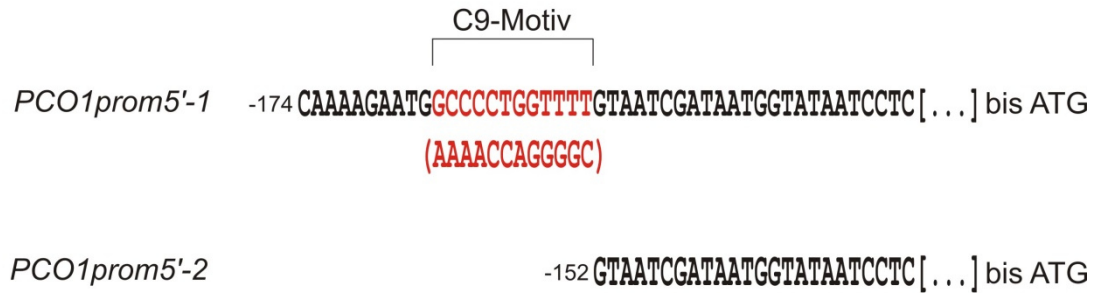


Abbildung 28: Das C9-Motiv ist ein essenzielles Element in *group VII*-ERF regulierten Promotoren I (a) Karte zeigt *LBD41*-Promotorfragmente, kloniert an die kodierende Sequenz der *firefly* *Luziferase* (*fLUC*), mit eingezeichneten Abständen zum ATG und Positionen von C9-Motiven sowie Substitutionen (rot) (siehe auch Legende Abbildung 21). (b) Vergleich von HA:RAP2.2-induzierten *fLUC*-Aktivitäten triplizierter Wildtyp- und mutierter Versionen der 33bp Region (3x33bpmin; mut1 und mut2) sowie einer *reverse complement* Version von 3x33bpmin_mut1 (mut1 revers). (c) Vergleich von HA:RAP2.2-induzierten *fLUC*-Aktivitäten des 589 bp-langen *LBD41prom5'-2:LUC*-Reporters mit Versionen, welche einzelne und kombinierte Punktmutationen in zwei C9-Motiven aufwiesen. Alle Messungen wurden in einem transienten, protoplastenbasierten Transaktivierungssystem mit *35S:Renilla Luziferase* (*rLUC*)-Normalisierung durchgeführt. Daten zeigen Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. *** repräsentiert signifikante Unterschiede zur HA:RAP2.2 induzierten, wildtypischen Promotoraktivität mit $p < 0,001$ und ** mit $p < 0,01$ (einfaktorielle ANOVA, unteres Signifikanzniveau $p < 0,05$). Änderung der Basalaktivität ist das *fLUC*/*rLUC*-Verhältnis, normalisiert auf eine HA:GFP-Effektorkontrolle.

Um die Relevanz des C9-Motivs für die *group* VII-ERF mediierte Promotoraktivierung, unabhängig vom Kontext des *LBD41*-Promotors zu testen, wurde der hypoxieresponsive Promotor der *PCO1* (Weits et al. 2014) analysiert. Dieser enthielt ein proximal vom ATG (-164 bp) gelegenes reverses C9-Motiv (AAAACCAGGGGC), welches identisch mit dem konservierten Motiv At5g15120A in Cluster 9 des vergleichenden phylogenetischen *Footprintings* war (Abbildung 26; Abbildung 29a). Darüber hinaus teilte es sich 100 % Sequenzidentität mit der Konsensussequenz von Cluster 9 und erreichte den höchsten *sig value* von allen C9-Motiven, die vom RSA tool "matrix scan" detektiert wurden (Tabelle A 6). Es wurden zwei Promotorversionen der *PCO1* bezüglich ihrer RAP2.2- und RAP2.12-Antwort miteinander verglichen (Abbildung 29). Die geringe Grundaktivität einer Promotorversion, die das C9-Motiv enthielt (*PCO1prom5'-1*), wurde durch die transiente Überexpression von *HA:RAP2.2* und *HA:RAP2.12* ähnlich stark erhöht, wie *LBD41prom5'-2* (Abbildung 21; Abbildung 29b). Eine 5'-Deletion von 22 bp Länge, welche das C9-Motiv entfernte, reduzierte die *group* VII-ERF-abhängige Aktivität auf ein Niveau, das ähnlich dem der effektivsten Nukleotidsubstitutionen im *LBD41prom5'-2* war (Abbildung 28c; Abbildung 29b). Aus den Daten der Substitutionen des *LBD41*-Promotors und den Deletionsanalysen des *PCO1*-Promotors wurde geschlossen, dass das C9-Motiv ein essenzielles CRE war, welches über RAP2.2 und RAP2.12 Hypoxie-induzierbare Gene aktivierte.

(a)



(b)

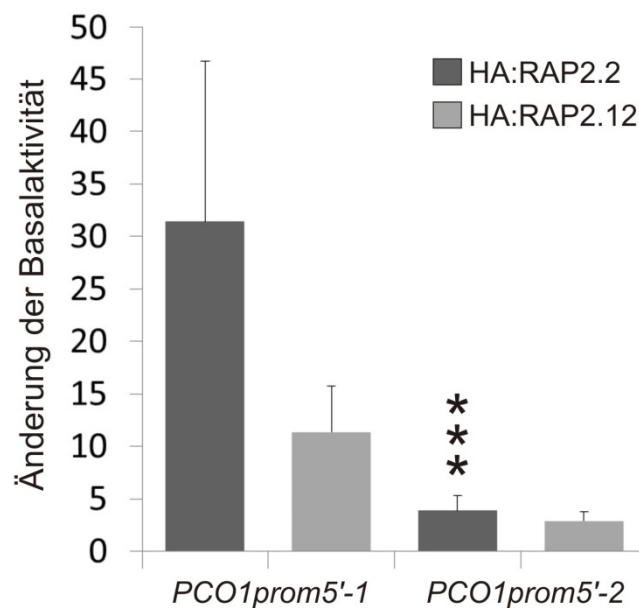


Abbildung 29: Das C9-Motiv ist ein essenzielles Element in *group VII*-ERF regulierten Promotoren II (a) Karte zeigt *PCO1*-Promotordelationen, kloniert an die kodierende Sequenz der *firefly* *Luziferase* (*fLUC*), mit eingezeichneten Abständen zum ATG und Position des *reverse complement* orientierten C9-Motivs (rot). (b) Vergleich von HA:RAP2.2- und HA:RAP2.12-induzierten *fLUC*-Aktivitäten beider Promotorversionen. Messungen wurden in einem transienten, protoplastenbasierten Transaktivierungssystem mit *35S:Renilla Luziferase* (*rLUC*)-Normalisierung, durchgeführt. Daten zeigen Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. *** repräsentiert signifikante Unterschiede zur induzierten Promotoraktivität von *PCO1prom5'-1* mit $p < 0,001$ (einfaktorielle ANOVA, unteres Signifikanzniveau $p < 0,05$). Änderung der Basalaktivität ist das *fLUC/rLUC*-Verhältnis, normalisiert auf eine HA:GFP Effektorkontrolle.

3.7.6. Das C9-Motiv teilt sich Sequenzinformationen und Funktionen mit dem ARE, aber nicht mit dem ATCTA

Obwohl mithilfe von Datenbanksuchen keine Übereinstimmung zwischen dem C9-Motiv und dem *Anoxia Responsive Element* (ARE) (Walker et al., 1987) gefunden wurde, teilten sich beide CREs große Sequenzähnlichkeiten. Das ARE des *ADH*-Promotors aus Mais bestand

aus zwei C9-Motiv-ähnlichen Subregionen. Jede Subregion war unterteilt in ein GT- und ein GC-reiches Motiv, welche jeweils starke Ähnlichkeiten zum AC-reichen- und GC-reichen Bereich des C9-Motivs aufwiesen. Basierend auf dieser Sequenzähnlichkeit wurde vermutet, dass beide ARE-Subregionen funktionale Versionen des C9-Motivs darstellten. Um zu testen, ob auch das ARE von *group* VII-ERFs direkt aktiviert wird, wurde ein LUC-Reporter konstruiert, welcher eine triplizierte Version des ARE des *ADH1*- Promotors aus *Arabidopsis thaliana* (Dolferus et al., 1994), gekoppelt an einen Minimalpromotor (3xARE_{min}:LUC), trug. Im Gegensatz zum 3x33bp:LUC besaß dieses Konstrukt im Protoplastensystem bereits eine hohe Basalaktivität in Abwesenheit von *group* VII-ERFs (Abbildung 30b). Diese Aktivität konnte durch die transiente Überexpression von *HA:RAP2.2* signifikant erhöht werden, ähnlich dem 3x33bp_{min} Promotor (Abbildung 30b). Darüber hinaus waren mit der AD versehene Versionen dieser TFs im heterologen H1H-System in der Lage, einen 3xARE:HIS Reporter zu aktivieren, was auf eine direkte DNA Bindung hindeutete (Abbildung 30a). Ebenso wie bei der 33bp Region reichte die Überexpression von anderen AD:*group* VII-ERF-Fusionen oder der AD alleine nicht aus, um das Hefewachstum auf –his-ura-trp+3AT Medium zu rekonstituieren (Abbildung 30a).

Ein CRE, welches in Zusammenhang mit *group* VII-ERFs gebracht wurde (Welsch et al., 2007; Licausi et al., 2011b), besaß eine ATCTA-Kernsequenz und damit keine Sequenzähnlichkeit zum ARE oder C9-Motiv. Mittels eines Gelretardierungsassays wurde die Interaktion zwischen RAP2.2 und einer 2xATCTA-enthaltenden Sonde (CAATCTAAATATCTAAAATATAAA, aus dem Promoter des Gens *PSY*) demonstriert (Welsch et al., 2007). Um eine direkte Aktivierung dieser Sequenz durch *group* VII-ERFs zu prüfen, wurde eine triplizierte Version der Sonde mit einem Minimalpromotor und einem LUC-Reportergen fusioniert. Im transienten Protoplastensystem zeigte sich, im Gegensatz zu 3x33bp_{min}:LUC und 3xARE_{min}:LUC, keine Erhöhung der Basalaktivität durch HA:RAP2.2 oder HA:RAP2.12 (Abbildung 30b). Dieses Ergebnis wurde durch das H1H-System untermauert, bei welchem ein 3xATCTA:HIS Reporter in Anwesenheit von AD:RAP2.2 oder AD:RAP2.12 keine stärkere Erhöhung zeigte als ein CES-1-responsiver Kontrollpromotor aus einem Tiersystem (Abbildung 30a; Abbildung 24). Aus den vorliegenden Daten wurde geschlossen, dass das C9-Motiv dem ARE in Sequenz und Funktion stark ähnelte. Die Interaktion zwischen *group* VII-ERFs und dem ATCTA-Element konnte hingegen nicht bestätigt werden.

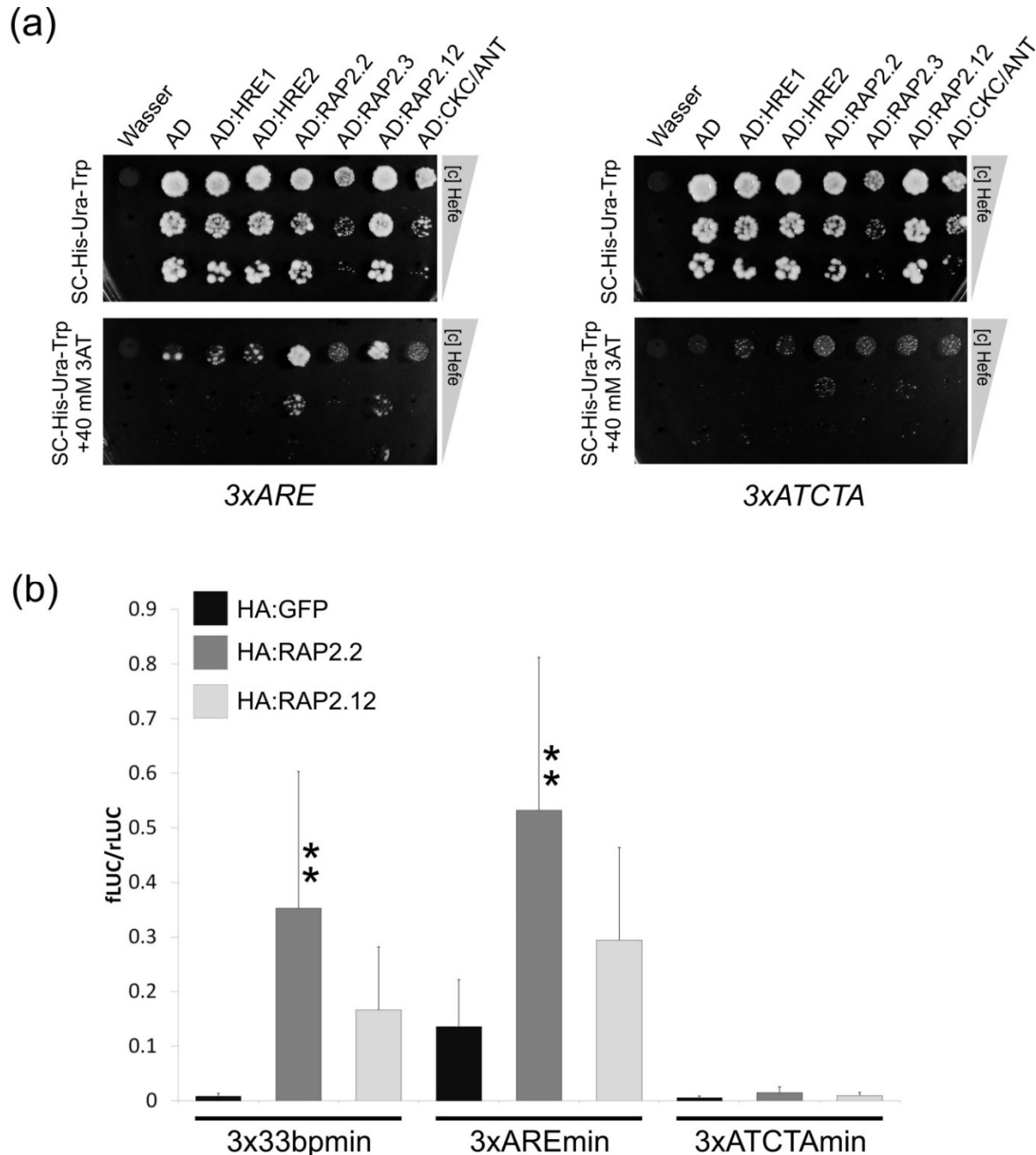


Abbildung 30: Funktionelle Ähnlichkeiten zwischen dem C9-Motiv und dem ARE (a) Hefe-1-Hybrid (H1H)-Assay mit stabilen 3xARE:HIS- und 3xATCTA:HIS Hefestämmen, welche transient N-terminale Fusionen von Aktivierungsdomänen (AD) und *group VII*-ERFs exprimierten. Wasser und ein AD-expimierender Vektor wurden als Negativkontrollen genutzt. Panele zeigen gleich verdünnte Hefetransformanten nach 5 d Wachstum auf Selektionsmedium mit und ohne HIS3-Inhibitor 3-Aminotriazol (3AT). **(b)** Effekt von HA:RAP2.2 und HA:RAP2.12 auf die triplizierte Version der 33bp-Region mit 35S-Minimalpromotor (*3x33bpmin*) fusioniert an einen *firefly* *Luziferase* Reporter (*fLUC*), im Vergleich zu äquivalenten Kontrukten mit der ARE-Sequenz (*3xAREmin*) und der ATCTA-Sequenz (*3xATCTAmin*). Messungen wurden in einem transienten, protoplastenbasierten Transaktivierungssystem mit *35S:Renilla Luziferase* (*rLUC*)-Normalisierung (*fLUC/rLUC*), durchgeführt. Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 6 Replikaten. ** repräsentiert signifikante Unterschiede zur basalen Promotoraktivität mit $p < 0,01$ (einfaktorielle ANOVA, unteres Signifikanzniveau $p < 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Entdeckung und Validierung von negativen Transregulatoren der Hypoxieantwort

Die Aktivierung von Genen unter Hypoxiestress hat einen positiven Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von Pflanzen (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011). Eine verhinderte Repression dieser Gene nach Wiederbelüftung steht aber im Verdacht, die Sterberate während der Erholungsphase zu erhöhen (Licausi et al., 2011b). Die NERP-abhängige Degradation von *group VII*-ERFs bietet keine ausreichende Erklärung für den schnellen Rückgang hypoxieresponsiver Transkripte nach Wiederbelüftung, da RAP2.12 länger im Nukleus residiert, als die mRNA seiner Zielgene (Kosmacz et al., 2014). Die verminderte transkriptionelle Aktivierung von *LBD41* durch RAP2.2 in Abwesenheit von CHX im Vergleich zur erhöhten Aktivierung unter CHX Einfluss weist auf einen RAP2.2-induzierten Repressor hin (Abbildung 19).

Da der Repressor HRA1 mehrere C9-Motive in seinem Promotor aufweist (Tabelle A 6) und durch RAP2.12 aktiviert wird (Licausi et al., 2011b), gilt er als potenzielles direktes Zielgen von RAP2.2 und RAP2.12. Tatsächlich ist nuklear lokalisiertes RAP2.2 in der Lage, *HRA1* trotz inhibierter Proteinsynthese zu aktivieren (Abbildung 19). HRA1 erhält seine repressorischen Eigenschaften hauptsächlich über Protein-Protein-Interaktion mit RAP2.12, aber keinem anderen *group VII*-ERF (Giuntoli et al., 2014). Da der negative Effekt auf *LBD41* aber in Anwesenheit von RAP2.2 stattfindet, muss die postulierte Repression auf einem anderen Mechanismus beruhen. Eine direkte Wechselwirkung von HRA1 mit seinem eigenen Promotor konnte auf eine kurze Sequenz stromaufwärts der TSS lokalisiert werden (Giuntoli et al., 2014). Die Autoren vermuteten, dass neben einer DNA-unabhängigen Wechselwirkung mit RAP2.12 zusätzlich eine Kompetition beider TFs um die RAP2.12-Bindestelle stattfinden könnte (Giuntoli et al., 2014). Tatsächlich enthält die HRA1-Bindestelle im eigenen Promotor zwei C9-Motive, von denen eines (At3g10040A) stark konserviert vorliegt (Abbildung 26; Tabelle A 6). Da RAP2.2 wie RAP2.12 mit dem C9-Motiv interagiert (Abbildung 23; Abbildung 28), könnte HRA1 auch im RAP2.2-Kontext als Repressor fungieren. Es bleibt allerdings fraglich, wieso eine Protein-DNA Interaktion von HRA1 nur bei sehr wenigen hypoxieresponsiven Genen stattfindet (Giuntoli et al., 2014). Trotz seiner Repressorfunktion ist HRA1 für eine posthypoxische Herabregulation von Hypoxiemarkergenen nicht essenziell, sondern verursacht eine negative Rückkopplung zum Zwecke der Feinregulation während Hypoxiestress (Giuntoli et al., 2014).

Unter den im PTA-Screening gefundenen potenziellen Repressoren ist RRTF1 der einzige Kandidat, welcher bei Wiederbelüftung aktiviert wird (Branco-Price et al., 2008), was eine mögliche Rolle bei der posthypoxischen Repression impliziert. Jedoch erscheint RRTF1 bei wiederholten Messungen nicht als starker Repressor und zeigt im vorliegenden Versuch keine Relevanz für die Hypoxietoleranz (Abbildung 8). Stattdessen wurde der ERF TF kürzlich als Transkriptionsaktivator beschrieben, welcher eine Rolle bei der Methyljasmonat-vermittelten Lateralwurzelbildung unter Kontrollbedingungen besitzt (Cai et al., 2014). Andere Kandidaten wie *KANADI1*, *ZFP1* oder die *COL*-Familie werden während oder nach Sauerstoffmangel nicht differenziell reguliert (Branco-Price et al., 2008; Mustroph et al., 2009).

KANADI1 ist in der Lage, den *LBD41*-Promotor signifikant zu reprimieren (Abbildung 9). Interessanterweise wurde *KANADI1* bereits im Vorfeld als direkter Repressor eines *LOB Domain* Gens, *ASYMMETRIC LEAVES 2 (AS2)*, charakterisiert (Wu et al., 2008). Jedoch dient diese Repression der Etablierung der Organpolarität (Wu et al., 2008), eine Funktion, die bisher nicht für *LBD41* beschrieben wurde. Die TFBS von *KANADI1* im *AS2*-Promotor (Wu et al., 2008) stimmt zudem nicht mit der 33bp Region überein, welche durch *KANADI1* reprimiert werden kann (Abbildung 9). Es sollte in zukünftigen Experimenten ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von negativ regulatorischen Proteindomänen von *KANADI1* einen generellen Repressoreffekt erzeugt.

Für *ZFP1* sind bisher keine Zielgene bekannt. Das spatiale Expressionsmuster von *ZFP1* im Apikalbereich und in Blattgefäßen (Chrispeels et al., 2000) ist dem von *HRA1* sehr ähnlich (Giuntoli et al., 2014). Diese Organe können in normaler Atmosphäre aufgrund eines erhöhten Sauerstoffbedarfs oder schlechter Sauerstoffpermeabilität hypoxische Zentren ausbilden (van Dongen et al., 2003; Geigenberger, 2003), was auch durch die erhöhte Expression hypoxieresponsiver Gene in diesen Geweben verdeutlicht wird (Dolferus et al., 1994; Chung und Ferl, 1999; Giuntoli et al., 2014). Passend dazu erniedrigt das Fehlen von *RAP2.2* und *RAP2.12* die Expression mehrerer hypoxieresponsiver Gene bereits unter normalen atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (Abbildung 16b). Eine Veränderung der lokalen *HRA1*-Expression durch einen ubiquitären Promotor verursacht pleiotrope Phänotypen unter Kontrollbedingungen, was eine Rolle für *HRA1* bei Entwicklungsvorgängen vermuten lässt (Giuntoli et al., 2014). Es ist möglich, dass *ZFP1*, welcher auch repressorische Eigenschaften aufweist (Abbildung 10), eine ähnliche Funktion besitzt. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass *ZFP1*, zusammen mit homologen Proteinen, Aufgaben bei der frühen Keimlingsentwicklung hat (Joseph et al., 2014). Eine Überexpression des *ZFP1*-homologen Proteins *ZFP3* führt unter anderem zu Zwergenwuchs und geringer Fertilität (Joseph et al., 2014), was auch bei *HRA1*-Überexpressionslinien

beobachtet wird (Giuntoli et al., 2014). Durch Manipulation der *ZFP1*-Expression könnten Zusammenhänge zwischen der Repression von Hypoxiegenen und Entwicklungsvorgängen unter Kontrollbedingungen entschlüsselt werden.

Das *CO*-Transkript zeigt eine circadiane Rhythmik mit einer verstärkten Akkumulation ab dem Nachmittag, während das Translationsprodukt in Dunkelheit degradiert wird. Somit ist eine erhöhte Abundanz von *CO* ein Maß für eine längere Lichtperiode, was zur Induktion der Blüte über die *CO*-vermittelte Aktivierung von *FLOWERING LOCUS T* führt (Golembeski et al., 2014). Andere *COL*-Gene unterliegen ebenfalls einer circadianen Rhythmik, sind aber nicht essenziell für eine korrekte Blühinduktion (Ledger et al., 2001; Hassidim et al., 2009) oder wirken ihr sogar entgegen (Cheng und Wang, 2005). Für *COL3* wurden Funktionen bei der Wurzelbildung, Photomorphogenese oder Sprossverzweigung festgestellt, was zeigt, dass *COL*-Proteine funktional nicht auf die Blühinduktion beschränkt sind (Datta et al., 2006). Dies wird auch durch die Responsivität einiger *COL*-Gene auf abiotische (Hannah et al., 2005; Mikkelsen und Thomashow, 2009) oder biotische (Ascencio-Ibáñez et al., 2008) Stressfaktoren verdeutlicht. Die in dieser Arbeit festgestellte Repression von NERP-Zielgenen stellt eine weitere Funktion von *COL*-Proteinen dar (Abbildung 6), welche *in vivo* durch Manipulation der Genexpression weiter bestätigt werden muss. Die deutliche Redundanz lässt aber bereits Spekulationen über den Repressionsmechanismus zu. Während geringe Nukleotidunterschiede zwischen *CO* und anderen *COLs* bereits große funktionelle Unterschiede auf physiologischer Ebene verursachen (Kim et al., 2013), kann auf der Ebene der Protein-Protein Interaktion eine größere Redundanz beobachtet werden (Fukamatsu et al., 2005; Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011). Den in *COL*-Proteinen vorkommenden BBX- und CCT-Domänen wurden häufiger Rollen bei der Interaktion mit Proteinen (Khanna et al., 2009) als mit DNA (Tiwari et al., 2010) zugeordnet. Da zudem die Präsenz eines EAR-Motivs in *COL*-Peptidsequenzen nicht mit Repressionseigenschaften korreliert, wird eine Interaktion mit einem Repressorprotein als Ursache für gemeinsame Repressionseigenschaften angenommen. BBX32 könnte ein wichtiges Bindeglied zwischen *COL*-Proteinen und NERP-Zielgenen sein, da es mit *COL2*, *COL5*, *BBX14* und *ACBP2* interagiert (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011), und *ACBP2* wiederum an *RAP2.3* und *RAP2.12* bindet (Li und Chye, 2004; Licausi et al., 2011b).

LBD41 ist der einzige Transkriptionsfaktor unter den 49 *core* Genen, welcher ein potenziell funktionelles EAR-Motiv in seiner Peptidsequenz aufweist (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009). Da er zudem mit den Co-Repressoren *TPL* und *TPR* interagiert (Causier et al., 2012), wird eine Funktion als Repressor vermutet. Ein Repressionsmechanismus, welcher, wie bei *HRA1*, auf der Interaktion oder Konkurrenz mit *group VII*-ERFs beruht, ist unwahrscheinlich

(Abbildung 11b). EAR-vermittelte Repression verläuft stattdessen über die Co-Repressor-vermittelte Rekrutierung von Chromatin remodellierenden Faktoren, wie HISTON DEACETYLASE 19 (Kagale und Rozwadowski, 2011). Fremde Plasmid-DNA nimmt in Eukaryoten chromatinähnliche Strukturen an (Reeves et al., 1985), was die Untersuchung von EAR-vermittelter Repression in transienten Systemen erlaubt. Tatsächlich zeigen sich repressorische Effekte von LBD41 auf mehrere hypoxieresponsive Promotoren, darunter *PCO1prom5'-1* und sein eigener (Abbildung 11). Dies könnte bedeuten, dass LBD41 die *group* VII-ERF-Akkumulation über eine direkte Repression von *PCO1* verstärkt. Eine Verdopplung der *HB1*-Promotoraktivität durch LBD41 (Licausi et al., 2011c) könnte durch diese putative *group* VII-ERF-Stabilisation erklärt werden. Außerdem könnte LBD41, wie HRA1, eine negative Rückkopplung zur Kontrolle der eigenen Aktivierung durchführen. *LBD41* ist ein direktes Zielgen von RAP2.2 und RAP2.12 (Abbildung 23) und könnte für die RAP2.2-induzierte, sekundäre Repression des eigenen Transkriptes (Abbildung 19) verantwortlich sein. Zur Bestätigung dieser Hypothese sollte das Experiment mit *lbd41*-Protoplasten wiederholt werden. Obwohl das C9-Motiv in *LBD41*-orthologen Promotoren und die Hypoxieantwort von *LBD41*-orthologen Transkripten stark konserviert sind (Mustroph et al., 2010), besitzt LBD41 in *Arabidopsis*-Keimlingen keine essenzielle Funktion für das Überleben unter Hypoxiestress (Luhua et al., 2013). Es bleibt offen, ob die beobachtete Repression von Hypoxiemarkergenen durch LBD41 eine physiologische Bedeutung hat, dies sollte in zukünftigen Projekten ermittelt werden.

4.2. Rolle von *group* VII-ERFs bei der Hypoxieantwort

4.2.1. Redundanz und Hierarchie von *group* VII-ERFs unter Sauerstoffmangel

Die funktionelle Redundanz der NERP-Substrate *group* VII-ERFs bei der Hypoxieantwort wurde in *Arabidopsis thaliana* auf den Ebenen der Genregulation und der Stressanfälligkeit untersucht (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b; Weits et al., 2014; Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015; Riber et al., 2015). Bis auf wenige Ausnahmen (Licausi et al., 2011b) weisen weitgehend konsistente Ergebnisse darauf hin, dass eine Überrepräsentation von *group* VII-ERFs das Überleben nach Überflutung oder Hypoxie begünstigt, während eine geringere Expression einen gegenteiligen Effekt hat (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b; Papdi et al., 2015; Riber et al., 2015). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen überleben Pflanzen mit Nullallelen für *RAP2.2* und *RAP2.12* Überflutungsbedingungen in Dunkelheit schlechter als der Col-0 Wildtyp oder eine *rap2.12*-Einzelmutante (Abbildung 17). Die Aussagekraft des Ergebnisses wird jedoch durch die ebenso große Anfälligkeit des Ler-0 Ökotyps herabgesenkt, da Ler-0-Genomanteile zur Etablierung der Doppelmutante eingekreuzt

wurden (Abbildung 14). Die geringere Überlebensrate einer *Landsberg-erecta Accession* im Vergleich zu Col-0 wurde bereits demonstriert (Vashisht et al., 2011) und geht mit einer schwächeren Genexpression unter Sauerstoffmangel einher (Abbildung 15). Dass dies auf einem kausalen Zusammenhang beruht, ist jedoch fraglich, da eine *rap2.12*-Mutante im Col-0 Hintergrund eine ähnlich schwache Geninduktion wie Ler-0 besitzt, jedoch eine starke Überlebensrate aufweist (Abbildung 15; Abbildung 17). Es ist auffällig, dass ein geringeres Wachstum mit einer schlechten Überlebensrate korreliert (Licausi et al., 2011b; Giuntoli et al., 2014; Weits et al., 2014). Möglicherweise liegt die Ursache der Anfälligkeit von Ler-0 gegenüber Überflutungsbedingungen in ihrer geringen Größe im Vergleich zu gleichaltrigen Col-0-Pflanzen begründet. Um eine bessere Aussagekraft zu gewährleisten, könnte man die experimentellen Bedingungen auf die LT_{50} (die Anzahl von Tagen, bei der die Hälfte der Population stirbt) des anfälligeren Ökotyps adjustieren oder die Größe der Pflanzen durch Variation des Alters angleichen.

Eine unerwartete Beobachtung ist, dass die *rap2.12*-Mutante eine tendenziell bessere Überlebensrate nach Überflutung aufweist als der zugehörige Wildtyp (Abbildung 17). Passend dazu zeigen *prt6*-Pflanzen, bei welchen RAP2.12 überrepräsentiert vorliegt, eine schlechtere Überlebensrate als Col-0 unter ähnlichen Bedingungen (Licausi et al., 2011b). Da der überwiegende Teil der Daten aber einen positiven Effekt von *group VII*-ERFs für das Überleben unter Hypoxie untermauert (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Gibbs et al., 2011; Weits et al., 2014; Riber et al., 2015), wird von einem versuchsbedingten Nebeneffekt ausgegangen. Die relative Luftfeuchtigkeit während der Regenerationsphase erwies sich als entscheidender Überlebensfaktor und kann die Anfälligkeit von *prt6*-Allelen gegenüber zugehörigen Wildtypen umkehren (Riber et al., 2015). Die niedrige Luftfeuchtigkeit von etwa 20 % im vorliegenden Experiment bietet daher eine Erklärung für die tendenzielle Hypoxieresistenz von *rap2.12*.

Die Redundanz von *group VII*-ERFs beim Überleben unter Sauerstoffmangel spiegelt sich auf Ebene der Genregulation wider (Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Licausi et al., 2011b; Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015). Die erhöhte ADH-Aktivität in Überexpressionslinien (Abbildung 13) und die Regulation mehrerer hypoxieresponsiver Promotoren durch *group VII*-ERFs (Abbildung 4; Abbildung 11a; Abbildung 23a; Abbildung 29; Abbildung 30b) untermauern diese Ergebnisse. Trotz der deutlichen Datenlage war bisher nicht genau bekannt, welchen quantitativen und hierarchischen Einfluss einzelne *group VII*-ERFs bei der redundanten Genregulation haben und auf welchem Mechanismus diese Redundanz beruht.

HRE1 und HRE2 sind schwach exprimiert und werden bei Sauerstoffmangel induziert, was deren Rolle als Initiatoren der Hypoxieantwort ausschließt (Licausi et al., 2010). Die

Transkriptanreicherung von Hypoxiemarkergenen kann bereits nach 30 min beobachtet werden (Liu et al., 2005; Kosmacz et al., 2014). Da die *hre1/2* Doppelmutante aber erst nach 4 h Hypoxie einen relativen Rückgang der Transkriptakkumulation von Hypoxiemarkergenen aufweist, scheinen diese TFs eher für den Erhalt des Induktionszustandes verantwortlich zu sein (Licausi et al., 2010). Eine *rap2.2/rap2.12*-Doppelmutante zeigt spätestens nach 2 h Hypoxiebehandlung eine dramatische Reduktion der hypoxiebedingten Transkriptakkumulation von mindestens 95 % (Abbildung 15). Da Einzelmutationen beider Gene bereits um etwa 50 % der wildtypischen Hypoxieantwort herabgesenkt sind, scheinen beide zu gleichen Teilen zur Antwort beizutragen (Abbildung 15). Dieses Ergebnis bestätigt das Expressionsmuster einer *artificial microRNA* (amiRNA)-Linie und einer Doppel T-DNA *knock down*-Linie (Licausi et al., 2011b; Bui et al., 2015), bei welchen *RAP2.2* und *RAP2.12* schwächer exprimiert sind und beweist, dass *RAP2.2* und *RAP2.12* gemeinsam eine essenzielle Rolle als Hauptaktivatoren der Hypoxieantwort spielen. Dies wird auch dadurch bestärkt, dass *RAP2.2* und *RAP2.12* im Vergleich zu anderen *group VII*-ERFs stets die größten Transaktivierungseigenschaften aufweisen (Bui et al., 2015; Abbildung 4; Abbildung 13; Abbildung 23a). Es ist zu erwarten, dass homologe Bindungsdomänen in gleichen Bindungskapazitäten resultieren (Bernard et al., 2012). Eine mechanistische Erklärung der Redundanz von *RAP2.2* und *RAP2.12* bietet daher das C9-Motiv als gemeinsame TFBS (Abbildung 23c). Um *RAP2.2* und *RAP2.12* eindeutig als Initiatoren der Hypoxieantwort zu klassifizieren, sollte eine zeitlich aufgelöste Transkriptmessung der Doppelmutante erfolgen, welche spätestens 30 min nach Beginn des Hypoxiezustandes beginnt. Es gibt aber bereits Hinweise darauf, dass *RAP2.2* und *RAP2.12* Initiatoren der Hypoxieantwort sind. Im Gegensatz zu *HRE1* und *HRE2* sind beide Gene bereits unter nicht-hypoxischen Zuständen exprimiert (Papdi et al., 2008; Hinz et al., 2010; Licausi et al., 2010; Licausi et al., 2011b), und das Translationsprodukt von *RAP2.12* sequestriert an der Plasmamembran, was eine schnelle Transaktivierung von Zielgenen im Nukleus ermöglicht (Licausi et al., 2011b; Kosmacz et al., 2014). Zur Induktion mehrerer Hypoxiemarkergene durch *RAP2.2* unter Normoxie bedarf es zudem keiner weiteren Proteinbiosynthese (Abbildung 19), was zeigt, dass weder Hypoxie- noch *RAP2.2*-induzierte Gene für deren Transaktivierung nötig sind.

Die im Vergleich zu *RAP2.2* und *RAP2.12* schwachen Transaktivierungskapazitäten von *HRE1* und *HRE2* auf den Promotor von *LBD41* weisen darauf hin, dass nicht alle NERP-regulierten Zielgene von *HRE1* und *HRE2* transkriptionell aufrechterhalten werden (Abbildung 4; Abbildung 23). Für die Hypoxiemarkergene *ADH1* und *PDC1* existieren jedoch mehrere Belege, dass insbesondere *HRE1* deren Transkription positiv beeinflusst (Licausi et al., 2010; Hess et al., 2011; Yang et al., 2011). Sowohl unter Hypoxie als auch bei Überexpression von *RAP2.2* führt Cycloheximid zu einer schwächeren Induktion der *ADH1* als unter cycloheximidfreien Bedingungen (Hoeren et al., 1998; Abbildung 19), was die

Existenz eines sekundären, RAP2.2-induzierten Aktivators impliziert. Dieser Aktivator bindet mit hoher Wahrscheinlichkeit an ein anderes CRE als RAP2.2 und RAP2.12, da eine sekundäre Verstärkung der Transkription einer 33bp-Region kontrollierten Gens nicht beobachtet werden kann (Abbildung 19). Die sekundäre Aktivierung durch RAP2.2 kann auch bei *PDC1* beobachtet werden (Abbildung 19). Passend dazu weist der Promotor *PDC1pr5'-4* eine positiv regulatorische Sequenz auf, welche durch RAP2.2 induziert wird, aber kein C9-Motiv enthält (Abbildung 20). Es ist naheliegend, dass HRE1 und möglicherweise auch HRE2 für diese Effekte verantwortlich sind. HRE1 aktiviert die *ADH1* und die *PDC1* (Licausi et al., 2010; Hess et al., 2011; Yang et al., 2011), interagiert aber nicht mit der gleichen TFBS wie RAP2.2 und RAP2.12 (Abbildung 23c). Es bleibt jedoch unbeantwortet, ob *HRE1* oder *HRE2* Zielgene von RAP2.2 oder RAP2.12 sind. Die Abwesenheit des C9-Motivs in deren Promotoren spricht gegen eine direkte Interaktion (Tabelle A 6). Da beide aber im *prt6*-Hintergrund transkriptionell aktiviert vorliegen (Gibbs et al., 2011), wird vermutet, dass sie sekundäre Zielgene der nicht hypoxieinduzierten NERP-Substrate sind. Dafür spricht auch, dass zur transkriptionellen Aktivierung von *HRE1* die Neusynthese mindestens eines Proteins nötig ist (Licausi et al., 2010).

Da in der von Licausi et al., (2011) untersuchten amiRNA Linie *RAP2.2* und *RAP2.12* und ihre Zielgene eine nachweisbare Restexpression aufwiesen, konnte nicht geklärt werden, ob beide TFs zur Aktivierung von Hypoxiegenen ausreichen oder nicht (Licausi et al., 2011b). Da es sich in der hier präsentierten Arbeit um Nullallele von *RAP2.2* und *RAP2.12* handelt, muss die geringe Restexpression von hypoxieresponsiven Genen (Abbildung 16) auf die Wirkung mindestens eines dritten Faktors zurückgehen. RAP2.3 ist ein *group VII*-ERF TF, für welchen während der Anfertigung dieses Manuskriptes (Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015) und im Zuge dieser Arbeit (Abbildung 4; Abbildung 13; Abbildung 23a) eine neue Funktion bei der Hypoxieantwort aufgedeckt wurde. Da *RAP2.3* wie *RAP2.2* und *RAP2.12* konstitutiv aktiviert vorliegt (Licausi et al., 2010; Papdi et al., 2015), eignet es sich besser zur Erklärung des frühen Resttranskripts bei *rap2.2/2.12* als HRE1 oder HRE2. Eigenschaften wie das Vorhandensein eines N-Terminus, welcher ein funktionales NERP Substrat darstellt (Gibbs et al., 2011), oder die Interaktion mit ACBP Proteinen (Li und Chye, 2004; Li et al., 2008), die auch für RAP2.12 gezeigt wurde (Licausi et al., 2011b), sprechen für eine redundante Beteiligung von RAP2.3 bei der Hypoxieantwort. Tatsächlich weist es im Vergleich zu den induzierten *group VII*-ERFs stärkere Transaktivierungseigenschaften auf (Bui et al., 2015; Abbildung 4; Abbildung 23a), und es teilt sich mit RAP2.2 und RAP2.12 eine Bindestelle, was nicht für HRE1 und HRE2 gilt (Abbildung 23).

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass in einigen Ökotypen wie Ler-0 eine *RAP2.3*-ähnliche Isoform existiert, die ebenfalls hypoxieresponsive Gene und Promotoren

aktivieren kann (Abbildung 4; Abbildung 23a). Auffällig ist, dass *RAP2.3* in den Ökotypen Col-0 und Cvi-0 ein Intron besitzt, aber in Ct-1, Kro-0, Kn-0, Sha, Sp-0 und Ler-0 nicht (Abbildung 12). Prozessierte Pseudogene stammen von exprimierten Genen ab, welche nach der mRNA Prozessierung durch Reverse Transkriptasen aus Retroelementen wieder in DNA umgeschrieben und zufällig ins Genom integriert wurden (Vanin, 1985; Weiner et al., 1986). Solche Sequenzen enthalten typischerweise keine Introns oder Promotoren, weisen aber einen 3' Poly-A Schwanz und repetitive Sequenzen an beiden Termini auf (Vanin, 1985). Genkopien, die auf diese Weise entstehen, werden oft nicht transkribiert und enthalten frühzeitige Stop-Codons oder Leserahmenverschiebungen und werden deshalb als prozessierte Pseudogene bezeichnet (Vanin, 1985). Ist aber aufgrund der zufälligen Insertion in einen Promotorbereich eine ausreichende Expression gewährleistet und kommt es zur Translation eines funktionalen Proteins, spricht man von funktionalen prozessierten Pseudogenen (Brosius, 1999) oder prozessierten Genen (Benovoy und Drouin, 2006). Intronfreie Gene und Pseudogene wurden bereits aus Pflanzen isoliert (Kvarnheden et al., 1995; McDowell et al., 1996; Drouin und Sá, 1997; Mladek et al., 2003). Allerdings konnte bisher nur eine intronfreie *Aktin*-Isoform aus *Solanum tuberosum* als eindeutiges prozessiertes Pseudogen charakterisiert werden, da es zudem einen 3' poly-A Schwanz und repetitive flankierende Sequenzen aufwies und sich nicht allelisch zu anderen Aktinengen verhielt (Drouin und Dover, 1987). In *Arabidopsis thaliana* wurden 35 prozessierte Gene vorhergesagt, von denen keines mit *RAP2.3* übereinstimmte (Benovoy und Drouin, 2006). Bei der *RAP2.3* Version in Ct-1, Kro-0, Kn-0, Sha, Sp-0 und Ler-0 könnte es sich dennoch um ein prozessiertes Gen handeln, da es intronfrei ist, laut Sequenzierung keine Kodierungsfehler aufweist und transkribiert wird (Abbildung 12). Dieser Hypothese folgend wäre aus einer intronhaltigen Version von *RAP2.3* ein prozessiertes Gen entstanden, das seine kodierende Sequenz beibehalten hat. Die ursprüngliche Version wäre zum intronhaltigen *CKC/ANT* mutiert. Dafür spricht, dass sich intronhaltige *RAP2.3* und *CKC/ANT*-Gene flankierende Sequenzen teilen, während die verkürzte *RAP2.3*-Version keiner Nachbarsequenz zugeordnet werden kann (Abbildung 12). Um dieses Erklärungsmodell zu prüfen, sollte zunächst die Existenz von *RAP2.3* und *CKC/ANT* am gleichen Genort, zum Beispiel mittels der sehr genauen Southern-Blot-Analyse, bestätigt werden. Außerdem sollte die Existenz der intronfreien Version von *RAP2.3* erneut unter Einbeziehung von Negativkontrollen, die eine Kontamination mit cDNA ausschließen, geprüft werden. Bestätigt sich dessen Existenz, sollte es auf weitere Merkmale eines prozessierten Gens, wie die Existenz eines benachbarten Poly-A Schwanzes und repetitive flankierende Sequenzen, untersucht werden. In Kombination mit phylogenetischen Analysen können anschließend Verwandtschaftsbeziehungen aufgeklärt werden. Um herauszufinden, ob *RAP2.3* und *CKC/ANT* tatsächlich für eine rudimentäre Hypoxieantwort von *rap2.2/2.12*

verantwortlich sind, sollten amorphe oder mindestens hypomorphe Allele beider Gene in *rap2.2/2.12* eingekreuzt werden.

4.3. Charakterisierung von hypoxieresponsiven Promotoren

4.3.1. Promotoren sind Ziele der NERP-abhängigen Hypoxieantwort

Eukaryotische Promotoren werden in zwei funktionale Bereiche gegliedert, welche sich überwiegend auf der 5'-Seite der TSS befinden: einen proximalen und einen distalen Teil (Porto et al., 2014). Der proximale Teil umfasst einen Bereich von etwa 500 bp und enthält unter anderem den essenziellen Minimalpromotor, welcher sich zwischen -35 und +35 bp um die TSS herum erstreckt (Butler und Kadonaga, 2002). Der Minimalpromotor dient der korrekten Positionierung der RNA Polymerase II im Präinitiationskomplex und garantiert ein basales Expressionslevel (Nikolov et al., 1996; Nikolov und Burley, 1997; Berk, 1999). 29% der Gene in *A.thaliana*, darunter *LBD41*, enthalten eine TATA-Box in diesem Promotorbereich (Molina und Grotewold, 2005). Die Position der TSS, und damit der 5' Startpunkt der 5' UTR, kann über die relative Position von Minimalpromotorelementen wie der TATA-box vorhergesagt oder über die Sequenzierung von cDNA-Klonen exakt bestimmt werden (Yamamoto und Obokata, 2008). Aufgrund von Widersprüchen bei der TSS-Annotation im *LBD41* Gen bei TAIR10 und der PlantPromoterdb (Yamamoto und Obokata, 2008) wurden in dieser Arbeit alle stromaufwärtsgelegenen Sequenzen ab dem Startcodon, und nicht ab der TSS isoliert und beinhalten somit die 5'UTR.

Der distale Promotorteil reguliert die räumlich-zeitliche Genexpression (Tjian und Maniatis, 1994; Fessele et al., 2002) und kann aus *Enhancern*, *Silencern*, Insulatoren, *Barrier elements* und Locus-Kontrollregionen bestehen (Maston et al., 2006). Dieser Bereich ist nicht genau über seine Distanz zur TSS definiert, weil zum Beispiel Enhancerelemente mehrere hundert Kilobasen stromaufwärts, aber auch stromabwärts eines Promotors liegen können, in einem Intron oder sogar auf der 3'-Seite eines Gens (Blackwood und Kadonaga, 1998). Solche isolierten Elemente sind vor allem in Tieren identifiziert worden (Rombauts et al., 2003), während für die räumlich-zeitliche oder induzierte Expression von Genen in pflanzlichen Systemen oft 1000 bp stromaufwärts der TSS ausreichen (Komarnytsky und Borisjuk, 2003). Damit übereinstimmend sind auch 5'-stromaufwärts gelegene Sequenzen von hypoxieresponsiven Genen mit Längen von unter 1000 bp ausreichend für die Induktion durch Hypoxie *in vivo* (Walker et al., 1987; Dolferus et al., 1994; Abbildung 2). Da intronfreie Reportergene ohne native 3'-UTR eine Transkriptakkumulation unter Hypoxie zeigen (Abbildung 2), scheinen potenzielle, vom Startcodon stromabwärtsgelegene CREs der hier getesteten Gene nicht essenziell zu sein. Obwohl dies für eine promotorregulierte *de novo*

mRNA-Synthese unter Hypoxie spricht, ist mindestens ein anderer Mechanismus der Transkriptakkumulation denkbar. Beim NERP-Zielgen *HRE2* (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b) wird vermutet, dass dessen untranslatierten Bereiche unter normalen Sauerstoffbedingungen zum konstitutiven Abbau einer stetig synthetisierten mRNA führen und zur Stabilisierung derselben unter Hypoxie (Licausi et al., 2010). Da die 5'-UTR, welche zur Transkriptstabilisierung beitragen kann (Pickering und Willis, 2005), im *in vivo GFP*-Reportersystem vorhanden war, wurde eine hypoxieabhängige posttranskriptionale Stabilisierung für die getesteten Gene zunächst nicht ausgeschlossen (Abbildung 2). Jedoch existieren starke Indizien, die für eine promotorabhängige Transkriptionsinduktion als Hauptregulationsmechanismus von Hypoxiemarkergenen wie *ADH1* und *LBD41* sprechen.

Dass der vollständige Verlust beider UTRs keinen signifikanten Einfluss auf das Hypoxieinduktionsmuster eines Promotors hat, wurde bisher nur für den Promotor der *ADH1* aus Mais bestätigt (Walker et al., 1987). Auch der Austausch der 5'-UTR im *A. thaliana* *LBD41*-Promotor mit einem TATA-box enthaltenden 35S-Minimalpromotor (*LBD41prom3'min-1*) führt nicht zur konstitutiven Aktivität unter Kontrollbedingungen und ist durch RAP2.2, einem Hauptaktivator der Hypoxieantwort, aktivierbar (Abbildung 21). In einem *RAP2.12*-Überexpressionssystem führt die Entfernung der 5'-UTR des *HB1* Gens zwar ebenfalls nicht zur konstitutiven Reporteraktivität, jedoch zum vollständigen Verlust der Induzierbarkeit durch RAP2.12 (Licausi et al., 2011b). Möglicherweise beruht dies aber auf der Deletion der TATA-box, welche sich laut PlantPromoterdb (Yamamoto und Obokata, 2008) innerhalb der 5' UTR von *HB1* befindet. Dass die NERP-abhängige Hypoxieantwort auf einer promotorregulierten Transkriptionsinduktion beruht, wird dadurch bestärkt, dass eine BD:RAP2.2-Fusion und AD:Fusionen mit anderen *group VII*-ERFs Reportergene promotorabhängig jeweils *in planta* sowie *in vitro* aktivieren können (Abbildung 19b, 22c, 23, 30a). Dieser Befund wird durch ähnliche Beobachtungen in anderen Studien gestützt (Welsch et al., 2007; Park et al., 2011; Licausi et al., 2011b; Seok et al., 2014). Außerdem interagieren *group VII*-ERFs physisch mit einem Promotorbereich von *LBD41* (Abbildung 23), welcher laut PlantPromoterdb stromaufwärts der TSS liegt (Yamamoto und Obokata, 2008). Eine UTR-freie, triplizierte Version dieses Bereichs ist zudem in der Lage, ein Reportergen hypoxieabhängig anzuschalten (Abbildung 22). Diese Daten stehen im Einklang mit dem aktuellen Modell der hypoxieinduzierten Kernlokalisation und Stabilisation von *group VII*-ERFs, welche Gene transkriptionell aktivieren, statt deren mRNA zu stabilisieren (Licausi et al., 2011b). Dies stellt eine essenzielle Prämisse dar, die es erlaubt, ein promotorlokalisiertes CRE zu identifizieren, welches von *group VII*-ERFs gebunden wird.

4.3.2. Deletionskartierung

Die Deletionskartierung von eukaryotischen Promotoren wurde erfolgreich in Hefe und menschlichen Expressionssystemen durchgeführt und ist seither eine etablierte Methode, um Promotorstrukturen zu studieren (Struhl, 1981; Tavernier et al., 1983). Da mit dieser Methode keine spezifische Protein-DNA Bindung nachgewiesen werden kann, wird sie oft mit Bindungsnachweisen kombiniert (Komarnytsky und Borisjuk, 2003). So wurde das ARE, welches essenziell und ausreichend für die Hypoxieinduktion eines Reportergens ist, durch Promotordeletionen in einem transienten, nicht normalisierten, semiquantitativen Reportersystem identifiziert (Walker et al., 1987). Transregulatoren des ARE wurden durch spätere EMSA-Analysen zwar nachgewiesen, aber nie kloniert (Fertl, 1990; Olive et al., 1991). Wird die Deletionskartierung in einem normalisierten, quantifizierbaren Expressionssystem durchgeführt, lassen sich im Gegensatz zu qualitativen Bindungsnachweisen genaue Aussagen über den quantitativen Effekt von TFs auf einzelne Promotorbereiche treffen (Abbildung 20; Abbildung 21). Nach der Identifikation von *group VII*-ERFs als wichtige Transaktivatoren unter Hypoxie wurde mittels einer quantifizierten Deletionskartierung versucht, RAP2.12 mit der ATCTA-Sequenz, welche in einem EMSA mit RAP2.2 interagiert (Welsch et al., 2007), funktional zu verknüpfen (Licausi et al., 2011b). Zwar führt die gleichzeitige Deletion von zwei ATCTA-Motiven im *HB1* Promotor zur Reduktion der RAP2.12-Induktion, jedoch machen diese nur 8 % der insgesamt gelöschten Sequenz aus, was die Relevanz des ATCTA-Motivs weiterhin hypothetisch erscheinen lässt.

4.3.3. Eignung des *LBD41* Promotors zur Identifikation eines hypoxieresponsiven cis-regulatorischen Elements

Der Promotor von *LBD41* erfüllt sämtliche Prämissen, um die Relevanz der ATCTA-Sequenz zu prüfen oder andere hypoxierelevante CREs zu identifizieren. *LBD41* ist unter hypoxischen Bedingungen stark und systemisch aktiviert (Mustroph et al., 2009), eine Eigenschaft, die auf den Promotor des Gens zurückgeht (Abbildung 2). Diese Antwort ist konserviert (Mustroph et al., 2010), was phylogenetische Metaanalysen des *LBD41*-Promotors erlaubt (Abbildung 21, 25). Da *LBD41* im genetischen Hintergrund von NERP-Mutanten und bei stabiler *RAP2.12*-Überexpression konstitutiv aktiviert vorliegt, scheint es ein Zielgen der NERP-Substrate *group VII*-ERFs zu sein. Tatsächlich ist der hypoxieresponsive Promotor *LBD41prom5'-2* im *prt6*-Hintergrund stärker aktiviert als im Col-0 Hintergrund (Abbildung 3). Die starke Aktivierung dieser und einer längeren Promotorversion (*LBD41prom5'-1a*) durch *group VII*-ERFs bestärkt diesen Befund (Abbildung 4, 22a). Da RAP2.2 für den *LBD41*-Promotor stets die größten Transaktivierungseigenschaften aufweist, stellt er ein geeignetes System dar, um die Relevanz der RAP2.2-gebundenen ATCTA-Sequenz per Deletionskartierung zu testen (Abbildung 4, 22a). Im Vergleich zu anderen Hypoxiemarkergenen wie *ADH1* oder *PDC1* wird *LBD41* außerdem direkt durch RAP2.2, aber nicht durch einen RAP2.2-

induzierten Aktivator sekundär weiter aktiviert (Abbildung 19c). Dies reduziert die Chance, bei der Deletionsanalyse auf eine sekundäre Zielsequenz von RAP2.2 zu stoßen.

4.3.4. Rolle der ATCTA-Sequenz bei Hypoxie

Die ATCTA-Sequenz scheint keine Relevanz für die *group* VII-ERF vermittelte Transkriptionsinduktion zu haben. Zwar ist das Motiv in hypoxieresponsiven Promotoren statistisch überrepräsentiert (Licausi et al., 2011c), jedoch kann kein Hinweis für dessen Konserviertheit in Promotoren mehrerer *core* Hypoxiemarkergenomen gefunden werden (Abbildung 26). Eine 5' Deletion von 126 bp im *HB1* Promotor führt zum Verlust von 2 ATCTA-Motiven und zur Reduktion der RAP2.12-vermittelten Induktion (Licausi et al., 2011b). Kurze Zufallssequenzen mit einem ATCTA-ähnlichen Verteilungsmuster, wie die Sequenz ATTTA, könnten den Effekt ebenfalls erklären. Bei der systematischen Deletion des hypoxieresponsiven Promotors *PDC1prom5'-4* hat der Verlust einer ATCTA-Sequenz im konservierten Bereich 3 und im benachbarten unkonservierten Bereich keinen Einfluss auf die RAP2.2-induzierte Promotoraktivität (Abbildung 20). Dass konservierte Bereiche für die RAP2.2-Induktion irrelevant sind, könnte zum Beispiel daran liegen, dass diese erst für die Repression des Gens bei Wiederbelüftung oder für Hypoxie-unabhängige Regulationen nötig sind. Im *LBD41prom5'-2* sind ATCTA-enhaltende Sequenzbereiche nicht konserviert (Abbildung 21). Die Deletion beider ATCTA-Motive hat eine unspezifische Reduktion der Basalaktivität zur Folge, aber die RAP2.2-vermittelte Änderung zur Basalaktivität wird nicht vermindert (Abbildung 21). Darüber hinaus zeigt der ATCTA-freie Promotor *PCO1prom5'-1* eine deutliche Aktivitätssteigerung durch RAP2.2 und RAP2.12 (Abbildung 29). Dass ATCTA-freie Sequenzen durch RAP2.2 induziert werden, könnte darin begründet sein, dass sie sekundäre Ziele von RAP2.2 sind. Eine isolierte und multimerisierte Promotorsequenz mit insgesamt 6 ATCTA-Motiven wird jedoch nicht durch RAP2.2 oder RAP2.12 aktiviert (Abbildung 30).

Eine Reduktion der *RAP2.2*-mRNA korreliert mit einer Reduktion der mRNA des ATCTA-enhaltenden Gens *PDS* (Welsch et al., 2007). Dem gegenüber steht, dass die mRNA des ATCTA-enhaltenden *PSY* und der durch diese Gene regulierte Carotinoidgehalt bei niedriger *RAP2.2*-Expression nicht sinkt (Welsch et al., 2007). Darüber hinaus werden *PSY* und *PDS* nicht durch einen gestörten NERP, eine *RAP2.12*-Überexpression oder durch Hypoxie transkriptionell aktiviert (Mustroph et al., 2009; Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b). Das ARE der Mais *ADH1* enthält die Subregion II, welche starke Ähnlichkeiten zur *group* VII-ERF-Zielsequenz, dem C9-Motiv aufweist (Walker et al., 1987). Im Zuge von Substitutionsmutationen für Bindungs- und Reporteranalysen in Mais wurde die ATCTA-Sequenz derart in das ARE eingebracht, dass es das konservierte, terminale GC-Paar der Subregion II ersetzte (Olive et al., 1991). Diese Version war nicht mehr in der Lage, mit der

Wildtyp-Variante um die Bindung von nuklearem Extrakt aus Maiszellen zu kompetieren. Darüber hinaus zeigte sie eine Reduktion der Hypoxieaktivierung auf statistisches Basalniveau (Olive et al., 1991). Zwar wurde ein NERP-analoger Mechanismus zur Hypoxieinduktion in Mais bisher nicht bewiesen, jedoch deutet die Existenz von *group VII*-ERFs in anderen Gräsern (Nakano et al., 2006; Xu et al., 2006; Jung et al., 2007; Hattori et al., 2009) und die kürzliche Entdeckung eines funktionalen NERP in *Hordeum vulgare* (Mendiondo et al., 2015) auf die Existenz dieses Signalweges auch in dieser monokotylen Spezies hin.

Die physische Interaktion zwischen RAP2.2 und der ATCTA-Sequenz in einem EMSA ist das stärkste Indiz für eine Rolle des ATCTA-Motivs bei der Sauerstoffmangelantwort (Welsch et al., 2007). Vorhergehende Reporterassays (Olive et al., 1991) und Messungen in dieser Arbeit (Abbildung 20, 20, 30) sprechen jedoch gegen eine Rolle bei Hypoxie. Schließlich kann die Interaktion zwischen RAP2.2 und ATCTA-Motiv mittels eines heterologen Assays nicht bestätigt werden (Abbildung 30). Es bleibt offen, ob RAP2.2 *in planta* mit der ATCTA-Sequenz interagiert und ob diese Interaktion eine physiologische Bedeutung hat. Zwar konnte in dieser Arbeit die Bindung von RAP2.2 an ein ATCTA-fremdes CRE nachgewiesen werden (Abbildung 23), aber multiple Bindungsaffinitäten von ERF TFs unter verschiedenen Stressbedingungen sind möglich (Cheng et al., 2013). *Chromatin-Immunoprecipitation Chip* (ChIP-on-Chip)- Analysen unter verschiedenen biotischen und abiotischen Einflüssen könnten stressabhängige Bindungsprofile von RAP2.2 *in vivo* aufklären.

4.3.5. Computerbasierte Vorhersagen von hypoxieresponsiven cis-Elementen

Die computerbasierte Vorhersage von Motiven beschleunigt die Identifikation von authentischen CREs (Das und Dai, 2007). Zur Identifikation von DNA-Mustern in Promotoren existieren drei mögliche Herangehensweisen (Das und Dai, 2007). Klassische Vorhersageprogramme nutzen mehrere Promotoren von co-regulierten Genen eines Genoms, um nach statistisch überrepräsentierten Motiven zu suchen (Rombauts et al., 1999). Dabei werden zwei Hauptalgorithmen unterschieden. Wort-basierte Algorithmen (auch: Strang-basierte Algorithmen) (van Helden et al., 1998) sind anfällig gegenüber degenerierten Motiven, denn sie erkennen nur kurze DNA Sequenzen mit einem stark konservierten Kern (Das und Dai, 2007). Darüber hinaus sinkt die Leistungsfähigkeit dieser Modelle mit steigender Länge der Motiv-enthaltenden Sequenzen, da deren Hintergrundrauschen das Signal einer konservierten Sequenz überlagern kann (Buhler und Tompa, 2002). Probabilistische Algorithmen (Hertz et al., 1990; Hertz und Stormo, 1999) sind in der Lage, auch degenerierte (kryptische) Motive zu detektieren, da der statistische Informationsgehalt eines *Alignments* berücksichtigt wird (Abbildung 25, 26). Zur Identifikation hypoxieregulierter CREs wurden sowohl wortbasierte Modelle (Liu et al., 2005; Hsu et al.,

2011; Licausi et al., 2011c) als auch probabilistische Modelle (Klok et al., 2002; Mohanty et al., 2005; Licausi et al., 2010; Licausi et al., 2011c; Mohanty et al., 2012) angewandt. Keines dieser und in der vorliegenden Arbeit gefundenen Motive passte exakt zur RAP2.2- und hypoxieresponsiven 33bp-Region. Allerdings stimmt das in der 33bp-Region enthaltene, degenerierte C9-Motiv zur Hälfte mit der häufig vorhergesagten MYB-Bindungssequenz AAACCA überein (Abbildung 26). Dies zeigt, dass wortbasierte Musterabgleiche, wie sie in dieser Arbeit mangels publizierter PSSMs durchgeführt wurden, wahr-positive Übereinstimmungen potenziell nicht erkennen. Zum anderen zeigt es, dass lange, degenerierte Motive auch von Überrepräsentationsanalysen, welche mit probabilistischen Algorithmen arbeiten, nicht verlässlich erkannt werden.

Die Problematik des Störsignals durch lange Bereiche zwischen TFBS kann durch eine andere Herangehensweise minimiert werden. Das phylogenetische *Footprinting* nutzt orthologe Promotorsequenzen eines Gens aus mehr als einem Genom (Tagle et al., 1988). Die zugrundeliegende Prämisse des phylogenetischen *Footprintings* ist, dass die Evolution von funktionalen TFBS aufgrund von Selektionsdruck langsamer verläuft als die von nicht-funktionalen Elementen (Das und Dai, 2007). Zwar sind gerade Änderungen der Genexpression für speziesspezifische Variationen verantwortlich (Doebley et al., 1997; Wang et al., 1999; Kopp et al., 2000; Sucena und Stern, 2000), aber ein speziessübergreifender Vergleich der transkriptionellen Hypoxieantwort hat deren Konserviertheit aufgedeckt (Mustroph et al., 2010). Dies, zusammen mit den Fakten, dass *group VII-ERF*-orthologe Gene in mehreren Spezies auftauchen (Licausi et al., 2011b), und dass die NERP-basierte Sauerstoffwahrnehmung in dikotylen (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b) und monokotylen (Mendiondo et al., 2015) Spezies existiert, macht das phylogenetische *Footprinting* zur vielversprechenden Methode für die Detektion von hypoxieresponsiven CREs. Die Wahl der evolutionären Distanz zwischen den zu vergleichenden Spezies ist kritisch (Cliften et al., 2001). Ist der Verwandtschaftsgrad zwischen den Spezies gering, versagen globale multiple *Alignments*, da die Lage der Motive unter Umständen nicht positiv selektiert ist (Cliften et al., 2001). Verbesserte Programme nutzen lokale *Alignment*-Algorithmen, um dieses Problem zu umgehen (Bailey und Elkan, 1994; Ait et al., 2013). Eine andere Problemlösestrategie ist die Durchführung eines phylogenetischen *Shadowings*, welches mit Sequenzen von vielen, aber nahe verwandten Spezies arbeitet (Boffelli et al., 2003; Hong et al., 2003). Obwohl diese Strategie informativ sein kann (Hong et al., 2003), zeigt sich auf Ebene der Konsensussequenz oft eine Auflösung, welche oberhalb der typischen Länge einer TFBS von 5 - 20 bp liegt (Cliften et al., 2001; Adrian et al., 2010). Der Informationsgehalt eines phylogenetischen *shadowings* sinkt offenbar zudem durch die Integration weniger Spezies (Abbildung 20, 21). Darüber hinaus führt die Untersuchung nur eines Promotors potenziell zur Detektion von Stimulus-

irrelevanten Sequenzen, vor allem wenn das Gen unter mehr als einer physiologischen Bedingung reguliert wird (Abbildung 20).

Die dritte Herangehensweise ist die Überrepräsentationsanalyse mit Promotoren co-regulierter Gene einer Spezies in Kombination mit phylogenetischen Informationen (Gelfand et al., 2000). Diese Strategie wurde mit Daten aus Mikroorganismen (Gelfand et al., 2000; McGuire et al., 2000), Tieren (Prakash et al., 2004) und Pflanzen (Wang et al., 2009b) durchgeführt und erweist sich für die Detektion von wahr-positiven Promotormotiven als effektiver als die jeweilige Einzelstrategie (Wang und Stormo, 2003; Sinha et al., 2004; Wang und Stormo, 2005; Maclsaac et al., 2006). Verschiedene Möglichkeiten, um beide Informationsebenen miteinander zu kombinieren, sind denkbar. Sowohl getrennte Vorhersagen aus co-regulierten und orthologen Datensätzen (Gelfand et al., 2000; McGuire et al., 2000) als auch eine Zusammenlegung beider vor der Analyse sind möglich (Prakash et al., 2004). Parallele Analysen mit finalem Vergleich zur Filterung von wahr-positiven Elementen wurde ebenso durchgeführt (Wang und Stormo, 2003) wie sequenzielle Herangehensweisen (GuhaThakurta et al., 2002; Cliften et al., 2003; Kellis et al., 2003). Bei letzteren können entweder überrepräsentierte Motive im co-regulierten Datensatz durch deren Präsenz in anderen Arten gefiltert werden (GuhaThakurta et al., 2002; Cliften et al., 2003), oder evolutionär konservierte Motive werden nach Überrepräsentation selektiert (Kellis et al., 2003).

Die in dieser Arbeit etablierte Methode des vergleichenden phylogenetischen *Footprintings* zählt zur dritten Herangehensweise und stellt eine sequenzielle Strategie dar, bei der konservierte Motive co-regulierter Gene miteinander verglichen werden (Abbildung 25, 26). Im Vergleich zu ähnlichen Durchführungen, bei denen die Konserviertheit als Filter von klassisch vorhergesagten Motiven angewendet wird (Cliften et al., 2003; Wang und Stormo, 2003), unterliegt das vergleichende phylogenetische *Footprinting* nicht den Limitierungen von Überrepräsentationsanalysen in co-regulierten Promotoren. Damit ist es in der Lage, Motive zu finden, welche nicht überrepräsentiert, aber dennoch relevant sind. Solche Motive könnten in komplexen Transkriptionsfaktorkaskaden oder -netzwerken vorkommen und wurden aufgrund fehlgeschlagener Vorhersagen mit nicht-phylogenetischen Methoden bei der Hypoxieantwort in dieser Arbeit vermutet. Tatsächlich ist in mehreren hypoxieresponsiven Promotoren, neben anderen Motiven, das bekannte ABRE (Marcotte et al., 1989; Mundy et al., 1990) evolutionär konserviert, jedoch nicht überrepräsentiert (Abbildung 26; Tabelle A 2). Eine andere Studie nutzte die Überrepräsentation als Filter von wahr-positiven, konservierten Motiven, jedoch nicht innerhalb eines co-regulierten Gensets (Kellis et al., 2003). Im Vergleich dazu werden im vergleichenden phylogenetischen *Footprinting* Motive mit einer spezifischen Relevanz für die transkriptionelle Antwort auf

einen einzelnen Stimulus, wie zum Beispiel Sauerstoff- oder Phosphatmangel, gefunden (Abbildung 25, 26). Tatsächlich wird die bekannte Bindestelle des Phosphatmangel-Regulators PHR1, P1BS (Rubio et al., 2001), mit dieser Strategie vorhergesagt (Abbildung 25). Obwohl Überrepresentationsanalysen nicht notwendig sind, schließt die Methode eine angeschaltete Analyse zur Anreicherung von TFBS nicht aus (Tabelle A 2). Überraschenderweise wird das C9-Motiv bei der Vorhersage in 49 hypoxieresponsiven Genen nicht gefunden, obwohl es unter ihnen im Vergleich zum *A. thaliana*-Genom angereichert ist (Tabelle A 2). Mögliche Ursachen können Unterschiede bei der Parameterwahl wie die erwartete Motivlänge, das Signifikanzniveau der Anreicherung oder die Wahl des negativen Hintergrunddatensatzes sein. Obwohl das vergleichende phylogenetische *Footprinting* den Prämissen und Limitierungen von klassischen phylogenetischen Promotoranalysen unterliegt, bietet es eine bessere Möglichkeit zur Vorhersage von Motiven, als vergleichbare oder Einzelstrategien. Dies betrifft vor allem die hohe Detektionsrate von wahr-positiven, stimulusspezifischen Elementen mit optionaler Anreicherung.

4.3.6. Das C9-Motiv ist ein authentisches cis-Element und Teil eines cis-regulatorischen Codes

In pflanzlichen Genomen existieren gut charakterisierte CREs, wie das ABRE (Marcotte et al., 1989; Mundy et al., 1990), die W-box (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994) und das *Dehydration-Responsive Element* (DRE) (Rushton et al., 1996), welche bei biotischen oder abiotischen Stressbedingungen Gene differenziell regulieren. Solche Motive zeichnen sich durch gemeinsame Eigenschaften aus, die sie in den Status von authentischen CREs heben (Zou et al., 2011). Die Präsenz oder Abwesenheit eines CREs in Promotoren reicht aber nicht aus, um stressresponsive Expressionsmuster zu erklären (Zou et al., 2011). Der cis-regulatorische Code zur Vorhersage von Expressionsmustern der biotischen und abiotischen Stressantwort in *Arabidopsis thaliana* setzt sich aus der Präsenz, Kombination, Anzahl und Position von CREs zusammen (Zou et al., 2011). Auch das C9-Motiv zeigt Charakteristika eines authentischen CREs und reicht aus, um den Kern der NERP-regulierten Hypoxieantwort zu erklären. Die signifikante Anreicherung eines CREs in den Promotoren der Gene, die es reguliert, ist das häufigste Authentisierungsmerkmal von CREs und wird zur Vorhersage von Promotormotiven genutzt (Das und Dai, 2007). Das C9-Motiv und das C6-Motiv, welche in manchen Promotoren überlappen, sind die einzigen komplexen Motive des vergleichenden phylogenetischen *Footprintings*, welche eine Anreicherung in 49 *core* Hypoxiegenen gegenüber allen Intergensequenzen des *A. thaliana* Genoms zeigen (Abbildung 26; Tabelle A 2). Motive mit geringer Komplexität scheinen hingegen keine hypoxiespezifische Relevanz zu besitzen (Abbildung 25). Neben einer signifikanten Anreicherung sind CREs typischerweise evolutionär konserviert (Wasserman et al., 2000;

Moses et al., 2003). Auch diese Eigenschaft ist dem C9-Motiv immanent und führte zur Beschleunigung der Identifikation desselben (Abbildung 26). Darüber hinaus korreliert die Konserviertheit mit dessen Funktion (Abbildung 21; Abbildung 22; Abbildung 28). Authentische CREs zeigen außerdem häufig eine signifikante Positionspräferenz, wie es in Hefe (Harbison et al., 2004), Menschen (Cooper et al., 2006) und Pflanzen (Maruyama et al., 2004; Tran et al., 2004; Zou et al., 2011) demonstriert wurde. Die Lage des C9-Motivs streut bis zu -500 bp stromaufwärts des Startcodons und zeigt eine signifikante Anreicherung zwischen -100 und -200 bp (Abbildung 27; Tabelle A 2). Stressresponsive CREs akkumulieren in Promotoren von *Arabidopsis thaliana* zwischen der TSS und 300 bp stromaufwärts (Zou et al., 2011). Unter Berücksichtigung der medianen Länge der 5'-UTR von 88 bp in *Arabidopsis* (Alexandrov et al., 2006) liegt das C9-Motiv exakt in diesem Bereich. Dass der Abstand des C9-Motivs zum Minimalpromotor eine funktionale Rolle spielt, zeigt auch der tendenzielle Rückgang der Promotoraktivität mit fortschreitenden 3'-Deletionen (Abbildung 21). Eine ähnliche Beobachtung kann bei der Deletion einer von zwei Kopien des C9-Motivs (Abbildung 21; Abbildung 28), und bei gezielten Substitutionsexperimenten (Abbildung 28) gemacht werden, was auch die Kopienzahl als relevant erscheinen lässt. Die Triplikation des C9-Motivs führt schließlich zur starken Aktivitätssteigerung (Abbildung 21). Die offensichtliche Relevanz von Position und Kopienzahl für die Funktion des C9-Motivs sind wichtige Indizien dafür, dass das C9-Motiv den Regeln des cis-regulatorischen Codes folgt (Zou et al., 2011). Eine systematische Analyse der Rolle von Position und Anzahl des C9-Motivs sollte künftig durchgeführt werden. Da der Abstand zwischen CRE- Kopien einen größeren Effekt haben kann als der Abstand zur TATA-Box (Rushton et al., 2002), sollte dieser in die Analyse einbezogen werden.

Die NERP-regulierte Hypoxieantwort kann durch das C9-Motiv erklärt werden. RAP2.2 und RAP2.12 sind Substrate des NERP (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011b) und für mindestens 95 % der Hypoxieinduktion von *LBD41* und anderen Genen verantwortlich (Abbildung 15). Beide interagieren direkt mit der 33bp-Region, welche das C9-Motiv trägt (Abbildung 23). Im Einklang mit diesen Befunden steht, dass die 33bp-Region und das C9-Motiv selbst essenziell für die RAP2.2- und RAP2.12-induzierte Promotoraktivität sind (Abbildung 21; Abbildung 28; Abbildung 29). In Übereinstimmung mit dem Modell, dass diese ERFs die Hypoxieantwort initiieren (Licausi et al., 2010), reicht die 33bp-Region für die Induktion durch die konstitutiv transkribierten *group VII*-ERFs (Abbildung 23) und durch Hypoxie (Abbildung 22) aus. Zukünftige Substitutionsexperimente sollten entschlüsseln, welche Nukleotide des C9-Motivs essenziell für die Bindung zu *group VII*-ERFs sind, und ob das Bindungsmuster mit der Hypoxieantwort korreliert. Außerdem sollte die Aktivität des C9-Motivs im genetischen Hintergrund von Einzel- und Mehrfachmutationen der *group VII*-ERFs quantifiziert werden.

Expressionsvorhersagemodelle werden genauer, wenn mögliche Kombinationen mehrerer CREs berücksichtigt werden (Zou et al., 2011). Es ist wahrscheinlich, dass neben dem C9-Motiv weitere CREs existieren, die zur Feinregulation der Hypoxieantwort nötig sind. Unter den hypoxieregulierten Genen befinden sich potenzielle und bestätigte TFs (Mustroph et al., 2009; Licausi et al., 2010; Licausi et al., 2011c; Giuntoli et al., 2014). HRE1 und HRE2 dienen der Aufrechterhaltung der Transkriptionsaktivität unter Sauerstoffmangel (Licausi et al., 2010), zeigen jedoch keine Bindung zum C9-Motiv (Abbildung 23). *ADH1* und *PDC1* werden durch einen unbekannten, von RAP2.2 induzierten Faktor verstärkt transkribiert (Abbildung 19). Zudem wird eine positiv regulatorische Region im *PDC1*-Promotor durch RAP2.2 induziert, welche kein C9-Motiv beinhaltet (Abbildung 20). Auch potenzielle Repressoren interagieren direkt oder indirekt mit hypoxieresponsiven Promotoren, aber nicht mit der 33bp-Region (Abbildung 6). Ein putativer Repressor des *LBD41*-Gens wird ebenfalls sekundär von RAP2.2 induziert (Abbildung 19). Darüber hinaus befinden sich evolutionär konservierte (Abbildung 26), und anderweitig vorhergesagte CREs in hypoxieresponsiven Promotoren (Klok et al., 2002; Liu et al., 2005; Mohanty et al., 2005; Licausi et al., 2010; Hsu et al., 2011; Licausi et al., 2011c; Mohanty et al., 2012). Zur vollständigen Entschlüsselung des cis-regulatorischen Codes der Genexpression bei Hypoxie sind die Entdeckung postulierter TFBS und die Validierung bereits vorhergesagter Motive notwendig. Die Beschreibung des C9-Motivs als authentisches CRE kann als zentraler Startpunkt dieser Analyse angesehen werden.

4.3.7. Abgrenzung zum ARE

Das ARE ist ein Enhancerelement, welches zwei essenzielle Subregionen enthält, die jeweils dem C9-Motiv stark ähneln (Walker et al., 1987; Olive et al., 1990). Jede Subregion besteht, wie das C9-Motiv auch, aus einer GC-reichen und einer GT-reichen Region (Walker et al., 1987). Dennoch konnte durch Datenbankabgleiche keine vollständige Übereinstimmung zwischen den ARE-Subregionen und dem C9-Motiv gefunden werden (Tabelle A 1). Obwohl Sequenz und Funktion des ARE ausführlich untersucht wurden, existiert keine Darstellung der Konsensussequenz, bei welcher Positionsfrequenzen oder -wahrscheinlichkeiten berücksichtigt werden, obwohl diese die Genauigkeit von Mustererkennungsprogrammen erhöhen würden (Stormo, 2000). Das C9-Motiv ist partiell degeneriert, was einen Wort-basierten Musterabgleich erschwert (Abbildung 26). Zudem können Sequenzunterschiede, welche nicht in der PSSM-Darstellung des C9-Motivs berücksichtigt werden, für das Scheitern von Musterabgleichen verantwortlich sein. Dies betrifft einerseits geringfügige Längenunterschiede beider ARE-Subregionen aus Mais zum C9-Motiv (Walker et al., 1987). Zum anderen liegt die GT-reiche Region des ARE-Äquivalents der *ADH1* aus *Arabidopsis thaliana* in revers komplementärer Orientierung vor (Dolferus et al., 1994).

Neben der starken Sequenzähnlichkeit teilen sich das C9-Motiv und das ARE weitere Eigenschaften. Beide Elemente werden innerhalb von 200 bp, relativ zur TSS gefunden (Walker et al., 1987; Dolferus et al., 1994). Dabei gibt es keine Orientierungspräferenz des C9-Motivs in hypoxieresponsiven Promotoren (Tabelle A 6) und es ist, wie das ARE auch, in beiden Orientierungen funktional (Olive et al., 1990). In synthetischen Reporterkonstrukten reicht eine Kopie einer Subregion des ARE, beziehungsweise ein C9-Motiv nicht aus, um ein Reportergen zu aktivieren, was für beide eine Relevanz der Kopienzahl impliziert (Olive et al., 1990). Die Tatsache, dass das ARE in putativ orthologen Promotoren einer monokotylen und einer eudikotylen Spezies auftaucht, deutet auf die Konserviertheit des Elements hin (Walker et al., 1987; Dolferus et al., 1994), eine Eigenschaft, die es sich mit dem C9-Motiv teilt (Abbildung 26). Darüber hinaus sind beide ausreichend für die Aktivierung eines Reportergens unter Sauerstoffmangelbedingungen (Walker et al., 1987; Olive et al., 1990). Untersuchungen des Mais ARE verweisen auf die Existenz von zwei distinkten Bindungsfaktoren, einem GT-bindenden (Ferl, 1990) und einem GC-bindenden Faktor (Olive et al., 1991). Im ARE von *Arabidopsis thaliana* hat die Deletion sowohl der GT-reichen Region als auch des GC-Motivs einen stressunspezifischen, negativen Effekt auf die Promotoraktivität zur Folge (Dolferus et al., 1994). Im Einklang damit führen Einzelnukleotidsubstitutionen in beiden Teilen des C9-Motivs auch zur Reduktion der RAP2.2-Aktivierung (Abbildung 28). Der GT-reiche Teil stellt eine MYB-TFBS mit AAC-Kern dar (Lüscher und Eisenman, 1990; Urao et al., 1993). Diese ist für die Genaktivierung unter Hypoxie essenziell und interagiert mit MYB2 (Hoeren et al., 1998). Die Präsenz von MYB2 ist hingegen nicht essenziell (Licausi et al., 2010), was vermuten lässt, dass andere MYB TFs für das Fehlen von MYB2 kompensieren können. RAP2.2 und RAP2.12 aktivieren die ARE-Sequenz (Abbildung 30), und ihre Präsenz ist essenziell für die Induktion des *ADH1*-Gens (Abbildung 15). Obwohl beide TFs mit dem ARE im H1H-System interagieren können (Abbildung 30), verweist die relativ schwache Aktivierung im Vergleich zum C9-Motiv auf Unterschiede in den Bindungskapazitäten. Diese sollten künftig durch *in vitro* Konkurrenzexperimente ermittelt werden. Es ist wahrscheinlich, dass RAP2.2 und RAP2.12 nicht an den GT-reichen, sondern an den GC-reichen Teil des ARE und des C9-Motivs binden. Zwar stellt dieser keine klassische ERF-Bindestelle dar (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995), aber andere GC-reiche Erkennungssequenzen wurden für ERF TFs bereits beschrieben (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Menke et al., 1999; Xue, 2003). Eine CG-Kernsequenz ist zudem für ERF-aktivierte CREs universell, während flankierende Sequenzen spezifische Erkennungssequenzen darstellen (Yang et al., 2009). Im Einklang damit führt die Mutation des terminalen, konservierten GC-Paars des C9-Motivs zur starken Beeinträchtigung der RAP2.2-Induktion (Abbildung 28). Eine äquivalente Mutation des ARE verhindert die Bindung des noch unidentifizierten GCBP-1 und die Hypoxieinduktion in

Maiszellen (Olive et al., 1991). Dies lässt die Spekulation zu, dass es sich bei GCBP-1 um einen oder mehrere ERF TFs handelt. Sollte es sich dabei um einen *group VII*-ERF handeln, wäre dies ein starkes Indiz für eine Homologie zwischen dem ARE und dem C9-Motiv.

Im ARE der *ADH1* aus Mais bedingt die Präsenz einer Subregion die Funktion der anderen (Walker et al., 1987). Die Interdependenz zweier eng benachbarter ARE-Subregionen kann nicht in Promotoren von *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden. Eine hypoxieresponsive Version des *LBD41*-Promotors enthält zwei C9-Motive (Abbildung 21), welche jedoch mit einem Abstand von 141 bp zueinander den tolerierbaren Abstand zwischen Subregion I und II des ARE in Mais überschreiten (Olive et al., 1990). Der Promotor der *ADH1* aus *Arabidopsis thaliana* enthält ebenfalls zwei Motive, die einer ARE-Subregion ähneln, jedoch bewirkt die Deletion des stromaufwärtsgelegenen Motivs keine Veränderung der Hypoxieinduktion (Dolferus et al., 1994). Zudem ist eine *PCO1*-Promotorversion mit nur einem C9-Motiv in der Lage, durch RAP2.2 und RAP2.12 aktiviert zu werden (Abbildung 29). Ein weiterer Unterschied zwischen dem ARE und dem C9-Motiv wird bei synthetischen Reporterkonstrukten beobachtet. Während das ARE aus Mais in Kombination mit dem nativen Minimalpromotor eine strikte Hypoxieantwort zeigt, führt die Einführung eines künstlichen Minimalpromotors aus dem CaMV 35S-Promotor zur konstitutiven Aktivität des Reporters (Olive et al., 1990). Das C9-Motiv behält hingegen seine niedrige Basalaktivität unter ambienten Bedingungen (Abbildung 21; Abbildung 22) und wird durch Hypoxie und *group VII*-ERFs aktiviert (Abbildung 22; Abbildung 23). In der vorliegenden Arbeit enthält der 35S-Minimalpromotor nicht das Octopinsynthase-Enhancerelement (Bouchez et al., 1989), welches für den generellen Enhancereffekt des ARE mitverantwortlich gemacht wurde (Olive et al., 1990). Eine andere Erklärung ist, dass für die Funktion des ARE, aber nicht für die des C9-Motivs, stromabwärtsgelegene CREs nötig sind, welche einer dauerhafte Aktivierung unter ambienten Bedingungen entgegenwirken. Die mehrfache Beobachtung, dass nukleare Faktoren dauerhaft an Subregionen des ARE gebunden bleiben (Fertl und Nick, 1987; Fertl, 1990; Olive et al., 1991), stützt die Hypothese eines konstitutiven Aktivierungsmechanismus, welcher bei Normoxie reprimiert werden muss. Dies steht zwar im Widerspruch zur hypoxieinduzierten Kerntranslokation von RAP2.12 und dessen Abbau bei Wiederbelüftung (Licausi et al., 2011b; Kosmacz et al., 2014) in *Arabidopsis thaliana*, jedoch sind monokotyledonenspezifische Mechanismen möglich. Dafür spricht, dass der hypoxierelevante *group VII*-ERF TF SUB1A aus Reis nicht über den NERP abgebaut wird (Gibbs et al., 2011).

Das C9-Motiv und das ARE teilen sich funktionale und sequenzbezogene Charakteristika. Da jedoch auch deutliche Unterschiede auf beiden Ebenen gefunden werden können, kann das C9-Motiv nicht als ARE-identisch angesehen werden. Daher wird die Umbenennung des

C9-Motifs zum ARE-Like Element (ALE) vorgeschlagen. Die Suche nach echten Homologien zwischen dem ARE der Mais *ADH1* und dem ALE sollte über DNA-Bindungsexperimente mit maisspezifischen *group* VII-ERFs erfolgen. Es bleibt eine spannende Frage, ob das postulierte GCBP-1 (Olive et al., 1991) ein *group* VII-ERF darstellt.

5. Literaturverzeichnis

- Adrian J, Farrona S, Reimer JJ, Albani MC, Coupland G, Turck F** (2010) cis-Regulatory elements und chromatin state coordinately control temporal und spatial expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 1425–1440
- Ait LA, Yamak Z, Morgenstern B** (2013) DIALIGN at GOBICS—multiple sequence alignment using various sources of external information. *Nucleic Acids Res* **41**: W3–W7
- Alexandrov NN, Troukhan ME, Brover VV, Tatarinova T, Flavell RB, Feldmann KA** (2006) Features of Arabidopsis genes und genome discovered using full-length cDNAs. *Plant Mol Biol* **60**: 69–85
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium** (2011) Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science* **333**: 601–607
- Armstrong J, Jones RE, Armstrong W** (2006) Rhizome phyllosphere oxygenation in Phragmites und other species in relation to redox potential, convective gas flow, submergence und aeration pathways. *New Phytol* **172**: 719–731
- Armstrong W** (1979) Aeration in Higher Plants. Academic Press, pp 225–332
- Armstrong W, Strange ME, Cringle S, Beckett PM** (1994) Microelectrode und Modelling Study of Oxygen Distribution in Roots. *Ann Bot* **74**: 287–299
- Ascencio-Ibáñez JT, Sozzani R, Lee T-J, Chu T-M, Wolfinger RD, Cella R, Hanley-Bowdoin L** (2008) Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response und cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol* **148**: 436–454
- Bailey-Serres J, Voeselek LACJ** (2008) Flooding stress: acclimations und genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 313–339
- Bailey TL, Elkan C** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol ISMB Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**: 28–36
- Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P** (2010) The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1471–1483
- Benovoy D, Drouin G** (2006) Processed pseudogenes, processed genes, und spontaneous mutations in the Arabidopsis genome. *J Mol Evol* **62**: 511–522
- Berk AJ** (1999) Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 330–335
- Bernard B, Thorsson V, Rovira H, Shmulevich I** (2012) Increasing coverage of transcription factor position weight matrices through domain-level homology. *PLoS One* **7**: e42779
- Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM** (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant J Cell Mol Biol* **49**: 810–828

- Blackwood EM, Kadonaga JT** (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* **281**: 60–63
- Boffelli D, McAuliffe J, Ovcharenko D, Lewis KD, Ovcharenko I, Pachter L, Rubin EM** (2003) Phylogenetic Shadowing of Primate Sequences to Find Functional Regions of the Human Genome. *Science* **299**: 1391–1394
- Bond DM, Wilson IW, Dennis ES, Pogson BJ, Jean Finnegan E** (2009) VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3) is required for the response of *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to low oxygen conditions. *Plant J Cell Mol Biol* **59**: 576–587
- Borisjuk L, Rolletschek H** (2009) The oxygen status of the developing seed. *New Phytol* **182**: 17–30
- Bouchez D, Tokuhiya JG, Llewellyn DJ, Dennis ES, Ellis JG** (1989) The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J* **8**: 4197–4204
- Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJH, Larive CK, Bailey-Serres J** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell Mol Biol* **56**: 743–755
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira RB, Bailey-Serres J** (2005) Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann Bot* **96**: 647–660
- Brosius J** (1999) RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. *Gene* **238**: 115–134
- Brudno M, Malde S, Poliakov A, Do CB, Couronne O, Dubchak I, Batzoglou S** (2003) Global alignment: finding rearrangements during alignment. *Bioinformatics* **19**: i54–i62
- Brudno M, Steinkamp R, Morgenstern B** (2004) The CHAOS/DIALIGN WWW server for multiple alignment of genomic sequences. *Nucleic Acids Res* **32**: W41–44
- Buhler J, Tompa M** (2002) Finding motifs using random projections. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol* **9**: 225–242
- Bui LT, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Licausi F** (2015) Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.03.008
- Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J** (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **6**: e1001102
- Butler JEF, Kadonaga JT** (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* **16**: 2583–2592
- Büttner M, Singh KB** (1997) *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5961–5966

- Cai X-T, Xu P, Zhao P-X, Liu R, Yu L-H, Xiang C-B** (2014) Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid und auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms6833
- Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B** (2012) The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant Physiol* **158**: 423–438
- Chang CJ, Li Y-H, Chen L-T, Chen W-C, Hsieh W-P, Shin J, Jane W-N, Chou S-J, Choi G, Hu J-M, et al** (2008) LZFI, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in Arabidopsis de-etiolation. *Plant J Cell Mol Biol* **54**: 205–219
- Cheng M-C, Liao P-M, Kuo W-W, Lin T-P** (2013) The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol* **162**: 1566–1582
- Cheng X-F, Wang Z-Y** (2005) Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO und FT in Arabidopsis thaliana. *Plant J Cell Mol Biol* **43**: 758–768
- Chervin C, Truett JK, Speirs J** (1999) Alcohol Dehydrogenase Expression und Alcohol Production during Pear Ripening. *J Am Soc Hortic Sci* **124**: 71–75
- Choy M-K, Sullivan JA, Theobald JC, Davies WJ, Gray JC** (2008) An Arabidopsis mutant able to green after extended dark periods shows decreased transcripts of seed protein genes und altered sensitivity to abscisic acid. *J Exp Bot* **59**: 3869–3884
- Chrispeels HE, Oettinger H, Janvier N, Tague BW** (2000) AtZFP1, encoding Arabidopsis thaliana C2H2 zinc-finger protein 1, is expressed downstream of photomorphogenic activation. *Plant Mol Biol* **42**: 279–290
- Christen P, Jaussi R** (2004) Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten. Springer
- Christianson JA, Wilson IW, Llewellyn DJ, Dennis ES** (2009) The low-oxygen-induced NAC domain transcription factor ANAC102 affects viability of Arabidopsis seeds following low-oxygen treatment. *Plant Physiol* **149**: 1724–1738
- Chung H-J, Ferl RJ** (1999) Arabidopsis Alcohol Dehydrogenase Expression in Both Shoots und Roots Is Conditioned by Root Growth Environment. *Plant Physiol* **121**: 429–436
- Clark LH, Harris WH** (1981) Observations on the Root Anatomy of Rice (*Oryza sativa* L.). *Am J Bot* **68**: 154–161
- Cliften PF, Hillier LW, Fulton L, Graves T, Miner T, Gish WR, Waterston RH, Johnston M** (2001) Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome Res* **11**: 1175–1186
- Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, Waterston R, Cohen BA, Johnston M** (2003) Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* **301**: 71–76
- Colmer TD** (2003) Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration und radial oxygen loss from roots. *Plant Cell Environ* **26**: 17–36
- Colmer TD, Greenway H** (2011) Ion transport in seminal und adventitious roots of cereals during O₂ deficiency. *J Exp Bot* **62**: 39–57

- Colmer TD, Voeselek LACJ** (2009) Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Funct Plant Biol* **36**: 665–681
- Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, Nguyen L, Myers RM** (2006) Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure und function in 1% of the human genome. *Genome Res* **16**: 1–10
- Cox MCH, Millenaar FF, Berkel YEM de J van, Peeters AJM, Voeselek LACJ** (2003) Plant Movement. Submergence-Induced Petiole Elongation in *Rumex palustris* Depends on Hyponastic Growth. *Plant Physiol* **132**: 282–291
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE** (2004) WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res* **14**: 1188–1190
- Das MK, Dai H-K** (2007) A survey of DNA motif finding algorithms. *BMC Bioinformatics* **8**: S21
- Datta S, Hettiarachchi GHCM, Deng X-W, Holm M** (2006) Arabidopsis CONSTANS-LIKE3 is a positive regulator of red light signaling und root growth. *Plant Cell* **18**: 70–84
- Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M, Grotewold E** (2003) AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements und transcription factors. *BMC Bioinformatics* **4**: 25
- Deplancke B, Mukhopadhyay A, Ao W, Elewa AM, Grove CA, Martinez NJ, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Reece-Hoyes JS, Hope IA, et al** (2006) A gene-centered *C. elegans* protein-DNA interaction network. *Cell* **125**: 1193–1205
- Doebley J, Stec A, Hubbard L** (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485–488
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, Dennis ES** (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Physiol* **105**: 1075–1087
- Van Dongen JT, Fröhlich A, Ramírez-Aguilar SJ, Schauer N, Fernie AR, Erban A, Kopka J, Clark J, Langer A, Geigenberger P** (2009) Transcript und metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. *Ann Bot* **103**: 269–280
- Van Dongen JT, Licausi F** (2015) Oxygen Sensing und Signaling. *Annu Rev Plant Biol.* doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114813
- Van Dongen JT, Schurr U, Pfister M, Geigenberger P** (2003) Phloem metabolism und function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol* **131**: 1529–1543
- Drew MC** (1997) OXYGEN DEFICIENCY und ROOT METABOLISM: Injury und Acclimation Under Hypoxia und Anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 223–250
- Drouin G, Dover GA** (1987) A plant processed pseudogene. *Nature* **328**: 557–558
- Drouin G, Sá MM de** (1997) Loss of Introns in the Pollen-Specific Actin Gene Subfamily Members of Potato und Tomato. *J Mol Evol* **45**: 509–513

- Ehlert A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W** (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C und group S bZIP transcription factors. *Plant J Cell Mol Biol* **46**: 890–900
- Ellis JG, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ** (1987) Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J* **6**: 11–16
- Ellis MH, Dennis ES, James Peacock W** (1999) Arabidopsis Roots und Shoots Have Different Mechanisms for Hypoxic Stress Tolerance. *Plant Physiol* **119**: 57–64
- Englbrecht CC, Schoof H, Böhm S** (2004) Conservation, diversification und expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. *BMC Genomics* **5**: 39
- Ferl RJ** (1990) ARF-B(2): A Protein Complex that Specifically Binds to Part of the Anaerobic Response Element of Maize Adh 1. *Plant Physiol* **93**: 1094–1101
- Ferl RJ, Nick HS** (1987) In vivo detection of regulatory factor binding sites in the 5' flanking region of maize Adh1. *J Biol Chem* **262**: 7947–7950
- Fessele S, Maier H, Zischek C, Nelson PJ, Werner T** (2002) Regulatory context is a crucial part of gene function. *Trends Genet TIG* **18**: 60–63
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I** (2004) VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **32**: W273–279
- Fukamatsu Y, Mitsui S, Yasuhara M, Tokioka Y, Ihara N, Fujita S, Kiyosue T** (2005) Identification of LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2)-interacting factors that can recruit LKP2 to nuclear bodies. *Plant Cell Physiol* **46**: 1340–1349
- Fukao T, Bailey-Serres J** (2008) Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 und SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 16814–16819
- Fukao T, Xu K, Ronald PC, Bailey-Serres J** (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic und developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* **18**: 2021–2034
- Garthwaite AJ, Bothmer R von, Colmer TD** (2003) Diversity in root aeration traits associated with waterlogging tolerance in the genus *Hordeum*. *Funct Plant Biol* **30**: 875–889
- Geffers R, Cerff R, Hehl R** (2000) Anaerobiosis-specific interaction of tobacco nuclear factors with cis-regulatory sequences in the maize GapC4 promoter. *Plant Mol Biol* **43**: 11–21
- Geffers R, Sell S, Cerff R, Hehl R** (2001) The TATA box und a Myb binding site are essential for anaerobic expression of a maize GapC4 minimal promoter in tobacco. *Biochim Biophys Acta* **1521**: 120–125
- Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 247–256

- Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M** (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem* **381**: 723–740
- Gelfand MS, Koonin EV, Mironov AA** (2000) Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. *Nucleic Acids Res* **28**: 695–705
- Genetello C, Van Larebeke N, Holsters M, De Picker A, Van Montagu M, Schell J** (1977) Ti plasmids of *Agrobacterium* as conjugative plasmids. *Nature* **265**: 561–563
- Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, et al** (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**: 415–418
- Gibbs J, Turner DW, Armstrong W, Darwent MJ, Greenway H** (1998) Response to oxygen deficiency in primary maize roots. I. Development of oxygen deficiency in the stele reduces radial solute transport to the xylem. *Funct Plant Biol* **25**: 745–758
- Giuliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, Cashmore AR** (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7089–7093
- Giuntoli B, Lee SC, Licausi F, Kosmacz M, Oosumi T, van Dongen JT, Bailey-Serres J, Perata P** (2014) A trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* **12**: e1001950
- Golembeski GS, Kinmonth-Schultz HA, Song YH, Imaizumi T** (2014) Photoperiodic flowering regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Adv Bot Res* **72**: 1–28
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, et al** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* **40**: D1178–D1186
- Graciet E, Mesiti F, Wellmer F** (2010) Structure und evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. *Plant J Cell Mol Biol* **61**: 741–751
- Grimoldi AA, Insausti P, Roitman GG, Soriano A** (1999) Responses to Flooding Intensity in *Leontodon taraxacoides*. *New Phytol* **141**: 119–128
- Guglielminetti L, Perata P, Alpi A** (1995) Effect of Anoxia on Carbohydrate Metabolism in Rice Seedlings. *Plant Physiol* **108**: 735–741
- GuhaThakurta D, Palomar L, Stormo GD, Tedesco P, Johnson TE, Walker DW, Lithgow G, Kim S, Link CD** (2002) Identification of a Novel cis-Regulatory Element Involved in the Heat Shock Response in *Caenorhabditis elegans* Using Microarray Gene Expression und Computational Methods. *Genome Res* **12**: 701–712
- Gumucio DL, Heilstedt-Williamson H, Gray TA, Tarlé SA, Shelton DA, Tagle DA, Slightom JL, Goodman M, Collins FS** (1992) Phylogenetic footprinting reveals a nuclear protein which binds to silencer sequences in the human gamma und epsilon globin genes. *Mol Cell Biol* **12**: 4919–4929
- Gupta KJ, Zabalza A, van Dongen JT** (2009) Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol Plant* **137**: 383–391

- Hannah MA, Heyer AG, Hinch DK** (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **1**: e26
- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A** (1998) Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem* **273**: 26857–26861
- Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne J-B, Reynolds DB, Yoo J, et al** (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99–104
- Hassidim M, Harir Y, Yakir E, Kron I, Green RM** (2009) Over-expression of CONSTANS-LIKE 5 can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*. *Planta* **230**: 481–491
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, et al** (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 und SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**: 1026–1030
- Van Helden J, André B, Collado-Vides J** (1998) Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J Mol Biol* **281**: 827–842
- Hertz GZ, Hartzell GW, Stormo GD** (1990) Identification of consensus patterns in unaligned DNA sequences known to be functionally related. *Comput Appl Biosci CABIOS* **6**: 81–92
- Hertz GZ, Stormo GD** (1999) Identifying DNA und protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinforma Oxf Engl* **15**: 563–577
- Hess N, Klode M, Anders M, Sauter M** (2011) The hypoxia responsive transcription factor genes ERF71/HRE2 und ERF73/HRE1 of *Arabidopsis* are differentially regulated by ethylene. *Physiol Plant* **143**: 41–49
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297–300
- Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES, Sauter M, Dolferus R** (2010) *Arabidopsis* RAP2.2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol* **153**: 757–772
- Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ, Dennis ES** (1998) Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* **149**: 479–490
- Holman TJ, Jones PD, Russell L, Medhurst A, Tomás SÚ, Talloji P, Marquez J, Schmuths H, Tung S-A, Taylor I, et al** (2009) The N-end rule pathway promotes seed germination und establishment through removal of ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 4549–4554
- Hong RL, Hamaguchi L, Busch MA, Weigel D** (2003) Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting und shadowing. *Plant Cell* **15**: 1296–1309
- Ho QT, Verboven P, Verlinden BE, Herremans E, Wevers M, Carmeliet J, Nicolaï BM** (2011) A three-dimensional multiscale model for gas exchange in fruit. *Plant Physiol* **155**: 1158–1168

- Hsu F-C, Chou M-Y, Chou S-J, Li Y-R, Peng H-P, Shih M-C** (2013) Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2699–2713
- Hsu F-C, Chou M-Y, Peng H-P, Chou S-J, Shih M-C** (2011) Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in Arabidopsis. *PloS One* **6**: e28888
- Huang S, Colmer TD, Millar AH** (2008) Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPi? *Trends Plant Sci* **13**: 221–227
- Huang T, Harrar Y, Lin C, Reinhart B, Newell NR, Talavera-Rauh F, Hokin SA, Barton MK, Kerstetter RA** (2014) Arabidopsis KANADI1 Acts as a Transcriptional Repressor by Interacting with a Specific cis-Element and Regulates Auxin Biosynthesis, Transport, and Signaling in Opposition to HD-ZIPIII Factors. *Plant Cell Online* **26**: 246–262
- Husbands A, Bell EM, Shuai B, Smith HMS, Springer PS** (2007) LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins. *Nucleic Acids Res* **35**: 6663–6671
- Ismond KP, Dolferus R, de Pauw M, Dennis ES, Good AG** (2003) Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol* **132**: 1292–1302
- Jackson MB, Dew MC** (1984) CHAPTER 3 - Effects of Flooding on Growth and Metabolism of Herbaceous Plants. *In* TT KOZLOWSKI, ed, Flooding Plant Growth. Academic Press, San Diego, pp 47–128
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF** (1998) Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104–106
- Joseph MP, Papdi C, Kozma-Bognár L, Nagy I, López-Carbonell M, Rigó G, Koncz C, Szabados L** (2014) The Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN3 Interferes with Abscissic Acid and Light Signaling in Seed Germination and Plant Development. *Plant Physiol* **165**: 1203–1220
- Jung J, Won SY, Suh SC, Kim H, Wing R, Jeong Y, Hwang I, Kim M** (2007) The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in Arabidopsis. *Planta* **225**: 575–588
- Jung K-H, Seo Y-S, Walia H, Cao P, Fukao T, Canlas PE, Amonpant F, Bailey-Serres J, Ronald PC** (2010) The submergence tolerance regulator Sub1A mediates stress-responsive expression of AP2/ERF transcription factors. *Plant Physiol* **152**: 1674–1692
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K** (2010) Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1109–1134
- Kagale S, Rozwadowski K** (2011) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* **6**: 141–146

- Karimi M, De Meyer B, Hilson P** (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* **10**: 103–105
- Kelliher T, Walbot V** (2014) Maize germinal cell initials accommodate hypoxia und precociously express meiotic genes. *Plant J* **77**: 639–652
- Kelliher T, Walbot V** (2012) Hypoxia Triggers Meiotic Fate Acquisition in Maize. *Science* **337**: 345–348
- Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES** (2003) Sequencing und comparison of yeast species to identify genes und regulatory elements. *Nature* **423**: 241–254
- Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS** (2001) KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* **411**: 706–709
- Khandelwal A, Elvitigala T, Ghosh B, Quatrano RS** (2008) Arabidopsis transcriptome reveals control circuits regulating redox homeostasis und the role of an AP2 transcription factor. *Plant Physiol* **148**: 2050–2058
- Khanna R, Kronmiller B, Maszle DR, Coupland G, Holm M, Mizuno T, Wu S-H** (2009) The Arabidopsis B-box zinc finger family. *Plant Cell* **21**: 3416–3420
- Kim S-K, Park H-Y, Jang YH, Lee JH, Kim J-K** (2013) The sequence variation responsible for the functional difference between the CONSTANS protein, und the CONSTANS-like (COL) 1 und COL2 proteins, resides mostly in the region encoded by their first exons. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol* **199-200**: 71–78
- Klecker M, Gasch P, Peisker H, Dörmann P, Schlicke H, Grimm B, Mustroph A** (2014) A Shoot-Specific Hypoxic Response of Arabidopsis Sheds Light on the Role of the Phosphate-Responsive Transcription Factor PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1. *Plant Physiol* **165**: 774–790
- Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R, Dennis ES** (2002) Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures. *Plant Cell* **14**: 2481–2494
- Komarnytsky S, Borisjuk N** (2003) Functional Analysis of Promoter Elements in Plants. *In* JK Setlow, ed, *Genet. Eng. (N. Y.)*. Springer US, pp 113–141
- Konings H** (1982) Ethylene-promoted formation of aerenchyma in seedling roots of Zea mays L. under aerated und non-aerated conditions. *Physiol Plant* **54**: 119–124
- Kopp A, Duncan I, Carroll SB** (2000) Genetic control und evolution of sexually dimorphic characters in Drosophila. *Nature* **408**: 553–559
- Kosmacz M, Parlanti S, Schwarzländer M, Kragler F, Licausi F, VAN Dongen JT** (2014) The stability und nuclear localization of the transcription factor RAP2.12 are dynamically regulated by oxygen concentration. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.12493
- Kumagai T, Ito S, Nakamichi N, Niwa Y, Murakami M, Yamashino T, Mizuno T** (2008) The common function of a novel subfamily of B-Box zinc finger proteins with reference to circadian-associated events in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 1539–1549

- Kürsteiner O, Dupuis I, Kuhlemeier C** (2003) The pyruvate decarboxylase1 gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiol* **132**: 968–978
- Kvarnheden A, Tandré K, Engström P** (1995) A cdc2 homologue und closely related processed retropseudogenes from Norway spruce. *Plant Mol Biol* **27**: 391–403
- Laanbroek HJ** (1990) Bacterial cycling of minerals that affect plant growth in waterlogged soils: a review. *Aquat Bot* **38**: 109–125
- Laan P, Berrevoets MJ, Lythe S, Armstrong W, Blom CWPM** (1989) Root Morphology und Aerenchyma Formation as Indicators of the Flood-Tolerance of *Rumex* Species. *J Ecol* **77**: 693–703
- Lara MV, Budde CO, Porrini L, Borsani J, Murray R, Andreo CS, Drincovich MF** (2011) Peach (*Prunus persica*) fruit response to anoxia: reversible ripening delay und biochemical changes. *Plant Cell Physiol* **52**: 392–403
- Lasanthi-Kudahettige R, Magneschi L, Loreti E, Gonzali S, Licausi F, Novi G, Beretta O, Vitulli F, Alpi A, Perata P** (2007) Transcript Profiling of the Anoxic Rice Coleoptile. *Plant Physiol* **144**: 218–231
- Lawrence CE, Altschul SF, Boguski MS, Liu JS, Neuwald AF, Wootton JC** (1993) Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science* **262**: 208–214
- Ledger S, Strayer C, Ashton F, Kay SA, Putterill J** (2001) Analysis of the function of two circadian-regulated CONSTANS-LIKE genes. *Plant J Cell Mol Biol* **26**: 15–22
- Lee JM, Joung J-G, McQuinn R, Chung M-Y, Fei Z, Tieman D, Klee H, Giovannoni J** (2012) Combined transcriptome, genetic diversity und metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening und carotenoid accumulation. *Plant J Cell Mol Biol* **70**: 191–204
- Lee SC, Mustroph A, Sasidharan R, Vashisht D, Pedersen O, Oosumi T, Voeselek LACJ, Bailey-Serres J** (2011) Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytol* **190**: 457–471
- Lee TG, Jang CS, Kim JY, Kim DS, Park JH, Kim DY, Seo YW** (2007) A Myb transcription factor (TaMyb1) from wheat roots is expressed during hypoxia: roles in response to the oxygen concentration in root environment und abiotic stresses. *Physiol Plant* **129**: 375–385
- Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, Perata P** (2010) HRE1 und HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell Mol Biol* **62**: 302–315
- Licausi F, Giorgi FM, Schmälzlin E, Usadel B, Perata P, van Dongen JT, Geigenberger P** (2011a) HRE-type genes are regulated by growth-related changes in internal oxygen concentrations during the normal development of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Plant Cell Physiol* **52**: 1957–1972
- Licausi F, Kosmacz M, Weits DA, Giuntoli B, Giorgi FM, Voeselek LACJ, Perata P, van Dongen JT** (2011b) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**: 419–422

- Licausi F, Weits DA, Pant BD, Scheible W-R, Geigenberger P, van Dongen JT** (2011c) Hypoxia responsive gene expression is mediated by various subsets of transcription factors und miRNAs that are determined by the actual oxygen availability. *New Phytol* **190**: 442–456
- Li H-Y, Chye M-L** (2004) Arabidopsis Acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with an ethylene-responsive element-binding protein, AtEBP, via its ankyrin repeats. *Plant Mol Biol* **54**: 233–243
- Li H-Y, Xiao S, Chye M-L** (2008) Ethylene- und pathogen-inducible Arabidopsis acyl-CoA-binding protein 4 interacts with an ethylene-responsive element binding protein. *J Exp Bot* **59**: 3997–4006
- Liu F, Vantoai T, Moy LP, Bock G, Linfoord LD, Quackenbush J** (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**: 1115–1129
- Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P** (2005) A Genome-Wide Analysis of the Effects of Sucrose on Gene Expression in Arabidopsis Seedlings under Anoxia. *Plant Physiol* **137**: 1130–1138
- Luhua S, Hegie A, Suzuki N, Shulaev E, Luo X, Cenariu D, Ma V, Kao S, Lim J, Gunay MB, et al** (2013) Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiol Plant* **148**: 322–333
- Lüscher B, Eisenman RN** (1990) New light on Myc und Myb. Part II. Myb. *Genes Dev* **4**: 2235–2241
- Maclsaac KD, Wang T, Gordon DB, Gifford DK, Stormo GD, Fraenkel E** (2006) An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**: 113
- Mahony S, Benos PV** (2007) STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res* **35**: W253–W258
- Manríquez D, El-Sharkawy I, Flores FB, El-Yahyaoui F, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech J-C** (2006) Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression und distinct biochemical characteristics. *Plant Mol Biol* **61**: 675–685
- Marcotte WR, Russell SH, Quatrano RS** (1989) Absciscic acid-responsive sequences from the em gene of wheat. *Plant Cell* **1**: 969–976
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J Cell Mol Biol* **38**: 982–993
- Maston GA, Evans SK, Green MR** (2006) Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 29–59
- Mattana M, Vannini C, Espen L, Bracale M, Genga A, Marsoni M, Iriti M, Bonazza V, Romagnoli F, Baldoni E, et al** (2007) The rice Mybleu transcription factor increases tolerance to oxygen deprivation in Arabidopsis plants. *Physiol Plant* **131**: 106–121

- McDowell JM, Huang S, McKinney EC, An YQ, Meagher RB** (1996) Structure und Evolution of the Actin Gene Family in *Arabidopsis Thaliana*. *Genetics* **142**: 587–602
- McGuire AM, Hughes JD, Church GM** (2000) Conservation of DNA regulatory motifs und discovery of new motifs in microbial genomes. *Genome Res* **10**: 744–757
- Mendondo GM, Gibbs DJ, Szurman-Zubrzycka M, Korn A, Marquez J, Szarejko I, Maluszynski M, King J, Axcell B, Smart K, et al** (2015) Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnol J*. doi: 10.1111/pbi.12334
- Menke FL, Champion A, Kijne JW, Memelink J** (1999) A novel jasmonate- und elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- und elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J* **18**: 4455–4463
- Métraux J-P, Kende H** (1983) The Role of Ethylene in the Growth Response of Submerged Deep Water Rice. *Plant Physiol* **72**: 441–446
- Mikkelsen MD, Thomashow MF** (2009) A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J Cell Mol Biol* **60**: 328–339
- Min T, Yin X, Shi Y, Luo Z, Yao Y, Grierson D, Ferguson IB, Chen K** (2012) Ethylene-responsive transcription factors interact with promoters of ADH und PDC involved in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit de-astringency. *J Exp Bot* **63**: 6393–6405
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **50**: 1232–1248
- Mladek C, Guger K, Hauser M-T** (2003) Identification und Characterization of the ARIADNE Gene Family in *Arabidopsis*. A Group of Putative E3 Ligases. *Plant Physiol* **131**: 27–40
- Mohanty B, Herath V, Wijaya E, Yeo HC, de Los Reyes BG, Lee D-Y** (2012) Patterns of cis-element enrichment reveal potential regulatory modules involved in the transcriptional regulation of anoxia response of japonica rice. *Gene* **511**: 235–242
- Mohanty B, Krishnan SPT, Swarup S, Bajic VB** (2005) Detection und preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Ann Bot* **96**: 669–681
- Moses AM, Chiang DY, Kellis M, Lander ES, Eisen MB** (2003) Position specific variation in the rate of evolution in transcription factor binding sites. *BMC Evol Biol* **3**: 19
- M. P. McDonald NWG** (2002) Similarity und diversity in adventitious root anatomy as related to root aeration among a range of wetland und dryland grass species. *Plant Cell Amp Environ* **25**: 441 – 451
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH** (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1406–1410
- Mustroph A, Albrecht G, Hajirezaei M, Grimm B, Biemelt S** (2005) Low Levels of Pyrophosphate in Transgenic Potato Plants Expressing *E. coli* Pyrophosphatase Lead to Decreased Vitality Under Oxygen Deficiency. *Ann Bot* **96**: 717–726

- Mustroph A, Lee SC, Oosumi T, Zanetti ME, Yang H, Ma K, Yaghoubi-Masihi A, Fukao T, Bailey-Serres J** (2010) Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol* **152**: 1484–1500
- Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J** (2009) Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18843–18848
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **140**: 411–432
- Narsai R, Howell KA, Carroll A, Ivanova A, Millar AH, Whelan J** (2009) Defining core metabolic and transcriptomic responses to oxygen availability in rice embryos and young seedlings. *Plant Physiol* **151**: 306–322
- Nikolov DB, Burley SK** (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 15–22
- Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Hoffman A, Roeder RG, Burley SK** (1996) Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4862–4867
- Ohme-Takagi M, Shinshi H** (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**: 173–182
- Olive MR, Peacock WJ, Dennis ES** (1991) The anaerobic responsive element contains two GC-rich sequences essential for binding a nuclear protein and hypoxic activation of the maize Adh1 promoter. *Nucleic Acids Res* **19**: 7053–7060
- Olive MR, Walker JC, Singh K, Dennis ES, Peacock WJ** (1990) Functional properties of the anaerobic responsive element of the maize Adh1 gene. *Plant Mol Biol* **15**: 593–604
- Ou B, Yin K-Q, Liu S-N, Yang Y, Gu T, Wing Hui JM, Zhang L, Miao J, Kondou Y, Matsui M, et al** (2011) A high-throughput screening system for Arabidopsis transcription factors and its application to Med25-dependent transcriptional regulation. *Mol Plant* **4**: 546–555
- Papdi C, Abrahám E, Joseph MP, Popescu C, Koncz C, Szabados L** (2008) Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol* **147**: 528–542
- Papdi C, Pérez-Salamó I, Joseph MP, Giuntoli B, Bögre L, Koncz C, Szabados L** (2015) The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the Ethylene Response Factor-VII genes RAP2.12, RAP2.2 and RAP2.3. *Plant J* n/a–n/a
- Park H-Y, Seok H-Y, Woo D-H, Lee S-Y, Tarte VN, Lee E-H, Lee C-H, Moon Y-H** (2011) AtERF71/HRE2 transcription factor mediates osmotic stress response as well as hypoxia response in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **414**: 135–141
- Paul AL, Vasil V, Vasil IK, Ferl RJ** (1987) Constitutive and anaerobically induced DNase-I-hypersensitive sites in the 5' region of the maize Adh1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 799–803

- Pickering BM, Willis AE** (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation und disease. *Semin Cell Dev Biol* **16**: 39–47
- Ponnamperuma FN** (1984) CHAPTER 2 - Effects of Flooding on Soils. *In* TT KOZLOWSKI, ed, *Flooding Plant Growth*. Academic Press, San Diego, pp 9–45
- Porto MS, Pinheiro MPN, Batista VGL, dos Santos RC, Filho P de AM, de Lima LM** (2014) Plant promoters: an approach of structure und function. *Mol Biotechnol* **56**: 38–49
- Prakash A, Blanchette M, Sinha S, Tompa M** (2004) Motif discovery in heterogeneous sequence data. *Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput* 348–359
- Proost S, Bel MV, Sterck L, Billiau K, Parys TV, Peer YV de, Vandepoele K** (2009) PLAZA: A Comparative Genomics Resource to Study Gene und Genome Evolution in Plants. *Plant Cell Online* **21**: 3718–3731
- Rahman M, Grover A, Peacock WJ, Dennis ES, Ellis MH** (2001) Effects of manipulation of pyruvate decarboxylase und alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *Funct Plant Biol* **28**: 1231–1241
- Reece-Hoyes JS, Deplancke B, Barrasa MI, Hatzold J, Smit RB, Arda HE, Pope PA, Gaudet J, Conradt B, Walhout AJM** (2009) The *C. elegans* Snail homolog CES-1 can activate gene expression in vivo und share targets with bHLH transcription factors. *Nucleic Acids Res* **37**: 3689–3698
- Reeves R, Gorman CM, Howard B** (1985) Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **13**: 3599–3615
- Riber W, Müller JT, Visser EJW, Sasidharan R, Voeselek LACJ, Mustroph A** (2015) The greening after extended darkness 1 is an N-end rule pathway mutant with high tolerance to submergence und starvation. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.114.253088
- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Piñeiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G** (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles und transgenic plants. *Plant J Cell Mol Biol* **28**: 619–631
- Rombauts S, Déhais P, Van Montagu M, Rouzé P** (1999) PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res* **27**: 295–296
- Rombauts S, Florquin K, Lescot M, Marchal K, Rouzé P, Van de Peer Y** (2003) Computational Approaches to Identify Promoters und cis-Regulatory Elements in Plant Genomes. *Plant Physiol* **132**: 1162–1176
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants und in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122–2133
- Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE** (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- und wound-induced signaling. *Plant Cell* **14**: 749–762
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE** (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J* **15**: 5690–5700

- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, und high-salinity stress conditions. *Plant Physiol* **136**: 2734–2746
- Santaniello A, Loreti E, Gonzali S, Novi G, Perata P** (2014) A reassessment of the role of sucrose synthase in the hypoxic sucrose-ethanol transition in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **37**: 2294–2302
- Seok H-Y, Tarte VN, Lee S-Y, Park H-Y, Moon Y-H** (2014) Arabidopsis HRE1 α , a splicing variant of AtERF73/HRE1, functions as a nuclear transcription activator in hypoxia response und root development. *Plant Cell Rep* **33**: 1255–1262
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, et al** (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985–2994
- Setter TL, Laureles EV** (1996) The beneficial effect of reduced elongation growth on submergence tolerance of rice. *J Exp Bot* **47**: 1551–1559
- Sinha S, Blanchette M, Tompa M** (2004) PhyME: a probabilistic algorithm for finding motifs in sets of orthologous sequences. *BMC Bioinformatics* **5**: 170
- Sriram SM, Kim BY, Kwon YT** (2011) The N-end rule pathway: emerging functions und molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 735–747
- Stahl DJ, Kloos DU, Hehl R** (2004) A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong und leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet. *BMC Biotechnol* **4**: 31
- Steffens B, Sauter M** (2005) Epidermal Cell Death in Rice Is Regulated by Ethylene, Gibberellin, und Absciscic Acid. *Plant Physiol* **139**: 713–721
- Steffens NO, Galuschka C, Schindler M, Bülow L, Hehl R** (2004) AthaMap: an online resource for in silico transcription factor binding sites in the Arabidopsis thaliana genome. *Nucleic Acids Res* **32**: D368–372
- Stormo GD** (2000) DNA binding sites: representation und discovery. *Bioinforma Oxf Engl* **16**: 16–23
- Stormo GD, Hartzell GW** (1989) Identifying protein-binding sites from unaligned DNA fragments. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 1183–1187
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA** (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**: 768–771
- Struhl K** (1981) Deletion mapping a eukaryotic promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4461–4465
- Sucena É, Stern DL** (2000) Divergence of larval morphology between *Drosophila sechellia* und its sibling species caused by cis-regulatory evolution of ovo/shaven-baby. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 4530–4534

- Summers JE, Ratcliffe RG, Jackson MB** (2000) Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus* absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large pasteur effect. *J Exp Bot* **51**: 1413–1422
- Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, Ma H, Martienssen R** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap und gene trap transposable elements. *Genes Dev* **9**: 1797–1810
- Tagle DA, Koop BF, Goodman M, Slightom JL, Hess DL, Jones RT** (1988) Embryonic epsilon und gamma globin genes of a prosimian primate (*Galago crassicaudatus*). Nucleotide und amino acid sequences, developmental regulation und phylogenetic footprints. *J Mol Biol* **203**: 439–455
- Takatsuji H** (1999) Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol Biol* **39**: 1073–1078
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, und maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739
- Tavernier J, Gheysen D, Duerinck F, Van der Heyden J, Fiers W** (1983) Deletion mapping of the inducible promoter of human IFN- β gene. *Nature* **301**: 634–636
- Thomson CJ, Armstrong W, Waters I, Greenway H** (1990) Aerenchyma formation und associated oxygen movement in seminal und nodal roots of wheat. *Plant Cell Environ* **13**: 395–403
- Tiwari SB, Shen Y, Chang H-C, Hou Y, Harris A, Ma SF, McPartland M, Hymus GJ, Adam L, Marion C, et al** (2010) The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytol* **187**: 57–66
- Tjian R, Maniatis T** (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**: 5–8
- Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Isolation und functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**: 2481–2498
- Turatsinze J-V, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J** (2008) Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites und cis-regulatory modules. *Nat Protoc* **3**: 1578–1588
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K** (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress und its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**: 1529–1539
- Vanin EF** (1985) Processed pseudogenes: characteristics und evolution. *Annu Rev Genet* **19**: 253–272
- Vashisht D, Hesselink A, Pierik R, Ammerlaan JMH, Bailey-Serres J, Visser EJW, Pedersen O, van Zanten M, Vreugdenhil D, Jamar DCL, et al** (2011) Natural variation of submergence tolerance among Arabidopsis thaliana accessions. *New Phytol* **190**: 299–310

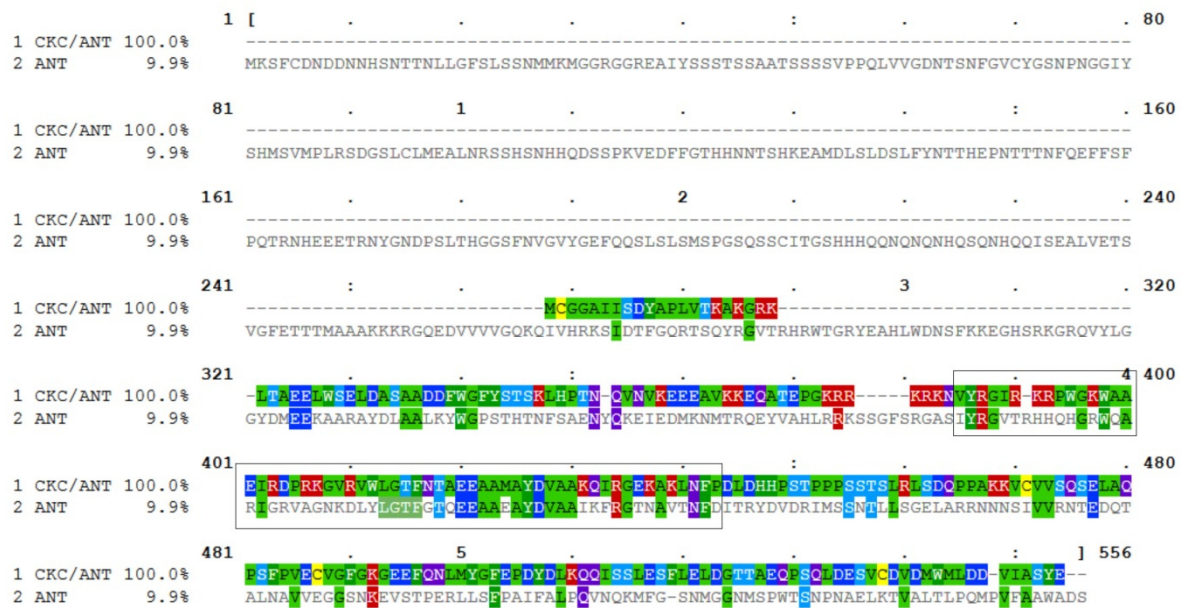
- Vergani P, Morandini P, Soave C** (1997) Complementation of a yeast delta *pkc1* mutant by the Arabidopsis protein ANT. *FEBS Lett* **400**: 243–246
- Visser E, Cohen JD, Barendse G, Blom C, Voeselek L** (1996a) An Ethylene-Mediated Increase in Sensitivity to Auxin Induces Adventitious Root Formation in Flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiol* **112**: 1687–1692
- Visser EJW, Blom CWPM, Voeselek L a. CJ** (1996b) Flooding-induced adventitious rooting in *Rumex*: morphology und development in an ecological perspective. *Acta Bot Neerlandica* **45**: 17–28
- Visser EJW, Colmer TD, Blom CWPM, Voeselek L a. CJ** (2000) Changes in growth, porosity, und radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- und dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. *Plant Cell Environ* **23**: 1237–1245
- Walker JC, Howard EA, Dennis ES, Peacock WJ** (1987) DNA sequences required for anaerobic expression of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6624–6628
- Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley J** (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**: 236–239
- Wang S, Yang S, Yin Y, Xi J, Li S, Hao D** (2009a) Molecular dynamics simulations reveal the disparity in specific recognition of GCC-box by AtERFs transcription factors super family in Arabidopsis. *J Mol Recognit JMR* **22**: 474–479
- Wang T, Stormo GD** (2003) Combining phylogenetic data with co-regulated genes to identify regulatory motifs. *Bioinformatics* **19**: 2369–2380
- Wang T, Stormo GD** (2005) Identifying the conserved network of cis-regulatory sites of a eukaryotic genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17400–17405
- Wang X, Haberer G, Mayer KFX** (2009b) Discovery of cis-elements between sorghum und rice using co-expression und evolutionary conservation. *BMC Genomics* **10**: 284
- Wang Z, Cao G, Wang X, Miao J, Liu X, Chen Z, Qu L-J, Gu H** (2008) Identification und characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep* **27**: 125–135
- Wasserman WW, Palumbo M, Thompson W, Fickett JW, Lawrence CE** (2000) Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat Genet* **26**: 225–228
- Wehner N, Hartmann L, Ehlert A, Böttner S, Oñate-Sánchez L, Dröge-Laser W** (2011) High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of Arabidopsis transcription factor function. *Plant J Cell Mol Biol* **68**: 560–569
- Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A** (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, und transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu Rev Biochem* **55**: 631–661
- Weits DA, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten H-M, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, van Dongen JT, Licausi F** (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms4425

- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P** (2007) Transcription factor RAP2.2 und its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **145**: 1073–1085
- Wu C-S, Kuo W-T, Chang C-Y, Kuo J-Y, Tsai Y-T, Yu S-M, Wu H-T, Chen P-W** (2014) The modified rice α Amy8 promoter confers high-level foreign gene expression in a novel hypoxia-inducible expression system in transgenic rice seedlings. *Plant Mol Biol* **85**: 147–161
- Wu G, Lin W, Huang T, Poethig RS, Springer PS, Kerstetter RA** (2008) KANADI1 regulates adaxial–abaxial polarity in Arabidopsis by directly repressing the transcription of ASYMMETRIC LEAVES2. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 16392–16397
- Xue G-P** (2003) The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *Plant J Cell Mol Biol* **33**: 373–383
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ** (2006a) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705–708
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251–264
- Yamamoto YY, Obokata J** (2008) ppdb: a plant promoter database. *Nucleic Acids Res* **36**: D977–981
- Yang C-Y** (2014) Hydrogen peroxide controls transcriptional responses of ERF73/HRE1 und ADH1 via modulation of ethylene signaling during hypoxic stress. *Planta* **239**: 877–885
- Yang C-Y, Hsu F-C, Li J-P, Wang N-N, Shih M-C** (2011a) The AP2/ERF transcription factor AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia in Arabidopsis. *Plant Physiol*. doi: 10.1104/pp.111.172486
- Yang S, Wang S, Liu X, Yu Y, Yue L, Wang X, Hao D** (2009) Four divergent Arabidopsis ethylene-responsive element-binding factor domains bind to a target DNA motif with a universal CG step core recognition und different flanking bases preference. *FEBS J* **276**: 7177–7186
- Zabalza A, Dongen JT van, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmälzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, et al** (2009) Regulation of Respiration und Fermentation to Control the Plant Internal Oxygen Concentration. *Plant Physiol* **149**: 1087–1098
- Zou C, Sun K, Mackaluso JD, Seddon AE, Jin R, Thomashow MF, Shiu S-H** (2011) Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14992–14997
- Zuo J, Niu Q-W, Chua N-H** (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**: 265–273

6. Anhang

[illegible]

Abbildung A 1 Die kodierende Sequenz von *CKC/ANT* ist RAP2.3-ähnlich aber nicht identisch
 ClustalW Alignment der kodierenden Sequenzen des resequenzierten *RAP2.3*-Effektorkonstruktes (Rap2.3KLON) mit *CKC/ANT* (ANT_vergani_; (Vergani et al., 1997), der RAP2.3-Sequenz aus Ler-0 (Ler-0.WTC chr3) und Col-0 (Col-0.MPI chr3). %-Werte geben die Sequenzidentität an.



AP2-Domäne

Abbildung A 2 CKC/ANT ist nicht identisch mit AINTEGUMENTA ClustalW Alignment der Aminosäuresequenzen von CKC/ANT (Vergani et al., 1997) und AINTEGUMENTA. %-Werte geben die Sequenzidentität an.

Tabelle A 1 Abgleiche von Clustermotiven der Phosphatmangel- und Hypoxieantwort mit den drei Datenbanken PLACE, AGRIS und AthaMap Zahlen neben Datenbankbezeichnungen sind Nummerierungen gefundener Motive

Phosphatmangel		PLACE1	PLACE2	PLACE3	PLACE4	PLACE5	AGRIS1	AGRIS2	AGRIS3	AGRIS4	AGRIS5	AthaMap1	AthaMap2	AthaMap3	AthaMap4	AthaMap5
Cluster1	Name	ABRECE3ZM BAB28														
	E value	2.50E-06														
Cluster2	Name	ACIPVPAL2														
	E value	9.52E-06														
Cluster3	Name	ABREMOTIFIII OSBAB16B	ABRE3OSRA B16	OCTAMOTIF2												
	E value	6.35E-05	6.76E-05	7.57E-05												
Cluster4	Name	GCCCCORE	AGCBOXNPG LB				ERF1	GCC-box				NIERF2	AB4_1			
	E value	7.28E-07	2.64E-05				7.28E-07	7.28E-07				2.14E-05	3.37E-05			
Cluster5	Name	GACA8HVBK N3	GAGAGMGSA 1	CTRMCAW3 5S												
	E value	0.00E+00	0.00E+00	2.81E-10												
Cluster6	Name	minus314MOT IFZMSBE1	MARTBOX	AGTACSAO	3AF1BOXPSR BCS3	BOX1PVCHS 15	CCA1_v3					GT- 3b_oneSite				
	E value	1.27E-12	1.72E-10	6.09E-10	6.10E-06	1.33E-05	4.73E-05					1.37E-06				
Cluster7	Name	ROOTMOTIF TAPOX1	P1BS									TaMYB80				
	E value	1.96E-05	6.84E-05									3.17E-06				
Sauerstoffmangel																
Cluster1	Name	GACA8HVBK N3	GAGAGMGSA 1	CTRMCAW3 5S												
	E value	0.00E+00	0.00E+00	1.25E-11												
Cluster2	Name	NODCON2GM	OSE2ROOTN ODULE	TL1ATSAR	IBOXCOREN T	GREGIONNT PBB1B	ibox					ARF1				
	E value	4.89E-06	4.89E-06	5.02E-06	1.16E-05	3.31E-05	4.90E-05					5.43E-05				
Cluster3	Name	minus314MOT IFZMSBE1	MARTBOX	AGTACSAO	3AF1BOXPSR BCS3	ELEMENTITG MLBC3	CCA1_v3					GT- 3b_oneSite				
	E value	5.50E-13	9.16E-11	7.45E-10	3.20E-06	7.98E-06	3.86E-05					1.23E-06				
Cluster4	Name	GCCCCORE	AGCBOXNPG LB	REGIONTOS OSEM	GRAZMRAB28		ERF1	GCC-box				AB4_1	NIERF2	AIERF- 1_twoSite	AIERF- 2_twoSite	AIERF- 5_twoSite
	E value	3.99E-08	1.70E-06	3.66E-05	8.89E-05		3.99E-08	3.99E-08				7.14E-11	2.40E-06	8.89E-05	8.89E-05	8.89E-05
Cluster5	Name	ABRECE1HV A22	RNFG2OS													
	E value	2.25E-05	6.06E-05													
Cluster6	Name	-----	-----	-----	-----	-----						AB4_1	GAMYB			
	E value	-----	-----	-----	-----	-----						1.36E-05	7.88E-05			
Cluster7	Name	GBOX10NT ABREBNAP A	ABADES12	ABRETAEM	ABREMOTIFIII OSBAB16B	ABFs	ABRE	CBF2	GBF1_2_3	G-box	ABF1	HY5	PIF3_1	AtMYC2_twoSite	AB6	
	E value	5.44E-12	2.44E-11	1.34E-10	1.85E-09	2.30E-09	2.32E-08	6.92E-07	1.18E-05	1.18E-05	2.30E-05	3.21E-07	1.15E-06	6.31E-06	2.32E-05	4.47E-05
Cluster8	Name	ACIPVPAL2	PALBOXPPC	ACIPVPAL2								AtMYB84				
	E value	7.02E-10	3.26E-06	6.94E-06								5.09E-08				
Cluster9	Name	MYB1AT	RNFG2OS	AMMORESVD CRN1A1												
	E value	4.56E-06	7.37E-06	4.83E-05												

Tabelle A 2 Überrepräsentationsanalyse von Clustermotiven der Hypoxieantwort in 49 *core* Genen und 100 bp Promotorsegmenten

Clustermotiv	Anzahl Clustermotiv tragender Gene innerhalb der 49 core Gene	Anzahl Clustermotiv tragender Gene unter 27416 proteinkodierender Gene im <i>A. thaliana</i> Genom	Hypergeometrische Wahrscheinlichkeit, dass mindestens diese Gene das Clustermotiv tragen	Bonferroni-korrigiert ($p < 10^{-4}$)	Anreicherung in 100 bp Promotorsegmenten (von 3000 bp) ($p < 10^{-4}$)
1	23	12474	0.474795727		repetitive Sequenzen als überlappende Motive gezählt (falsch positiv)
2	11	4189	0.118221595		keine
3	37	8299	8.49E-11	signifikant	repetitive Sequenzen als überlappende Motive gezählt (falsch positiv)
4	12	5165	0.199873193		keine
5	13	4735	0.068744781		keine
6	19	2529	2.51E-08	signifikant	zwischen -100 and -200 bp; pWert 0.0000752067488299179
7	12	4987	0.167569301		keine
8	20	3928	5.34579E-06	signifikant	keine
9	26	2149	1.52E-16	signifikant	zwischen -100 and -200 bp; pWert 1.08565303690616E-12

Tabelle A 3 Überrepräsentationsanalyse von Clustermotiv-tragenden *core* Genen in verschiedenen Expressionsdatensätzen n ist die Anzahl Clustermotiv-tragender *core*-Gene in den angegebenen Expressionsdatensätzen und p ist die hypergeometrische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten mindestens dieser Anzahl im Vergleich zum Anteil aus 49 *core* Genen.

Clustermotive (Anzahl Träger unter 49 core Genen)	C1 (23)		C2 (11)		C3 (36)		C4 (11)		C5 (12)		C6 (19)		C7 (12)		C8 (20)		C9 (26)	
	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
30 min, 1% vs. 21% O ₂ (van Dongen et al., 2009)	18	0.46	8	0.74	29	0.16	6	0.98	10	0.38	15	0.46	9	0.67	11	0.99	23	0.027
<i>ate1/2</i> vs. Col-0 (Gibbs et al., 2011)	10	0.96	4	0.96	21	0.33	3	0.99	8	0.27	11	0.49	4	0.98	6	0.99	19	0.008
<i>prt6</i> vs. Col-0 (Gibbs et al., 2011)	11	0.89	4	0.96	20	0.58	4	0.96	8	0.27	12	0.27	5	0.92	7	0.99	20	0.001

Tabelle A 4 Verwendete Vektoren und Klonierungsprodukte und die zur Klonierung verwendeten Primer Bezeichnung und Sequenzen aller Primer kann Tabelle A 5 entnommen werden

Kloniervektor	Quelle	Derivate	Primer und Oligonukleotide	
pGATA:HF-GFP-RPL18	Mustroph et al. 2009	pLBD41prom5'-1:HF-GFP-RPL18	59	61
		pLBD41prom5'-2:HF-GFP-RPL18	60	61
		pPDC1prom5'-1:HF-GFP-RPL18	62	64
		pPDC1prom5'-4:HF-GFP-RPL18	63	64
		pAt10270prom5'-1:HF-GFP-RPL18	65	67
		pAt10270prom5'-2:HF-GFP-RPL18	66	67
pBT10GAL4UAS	Wehner et al. 2011	pLBD41prom5'-1a:LUC	68	70
		pLBD41prom5'-2:LUC	69	70
		pLBD41prom5'-2_a:LUC	71	72
		pLBD41prom5'-2_b:LUC	73	74
		pLBD41prom5'-2_c:LUC	75	76
		pLBD41prom5'-2_d:LUC	77	78
		pLBD41prom5'-2_e:LUC	79	80
		pLBD41prom5'-2_f:LUC	81	82
		pLBD41prom5'-3:LUC	83	88
		pLBD41prom5'-4:LUC	84	88
		pLBD41prom5'-5:LUC	85	88
		pLBD41prom5'-6:LUC	86	88
		pLBD41prom5'-7:LUC	87	88
		pPCO1prom1:LUC	89	91
		pPCO1prom2:LUC	90	91
		pPDC1prom5'-1:LUC	92	101

		pPDC1prom5'-4:LUC	93	101
		pPDC1prom5'-5:LUC	94	101
		pPDC1prom5'-6:LUC	95	101
		pPDC1prom5'-7:LUC	96	101
		pPDC1prom5'-8:LUC	97	101
		pPDC1prom5'-9:LUC	98	101
		pPDC1prom5'-10:LUC	99	101
		pPDC1prom5'-11:LUC	100	101
		pAt5g44730prom5'-1:LUC	102	103
		pAt5g20790prom5'-1:LUC	104	105
		pMGD3prom5'-1:LUC	106	107
		pmin:LUC	108	109
		pLBD41prom3'min-1:LUC	84	110
		pLBD41prom3'min-2:LUC	84	111
		pLBD41prom3'min-3:LUC	84	112
		pLBD41prom3'min-4:LUC	84	113
		p3x33bpmin:LUC	114	115
		p3x33bp_mut1_min:LUC	116	117
		p3x33bp_mut1reverse_min:LUC	116	117
		p3x33bp_mut2_min:LUC	118	119
		p3xAREmin:LUC	120	121
		p3xATCTAmin:LUC	122	123
pHBTl-HA-GW	Wehner et al. 2011	p35S:HA-LBD41 (pEN_LBD41 von Willi Riber)		
		p35S:HA:ZFP1	124	125
		p35S:HA:ZFP1ΔEAR	124	126

		p35S:HA:RAP2.3	127	128
		p35S:HA-GFP (pEN_GFP von Natalia Hess)		
pHBTL-GW-C'HA	Wehner et al. 2011	pHBTL-GW:HA:VP16	129	130
		p35S:LBD41ΔEAR:HA:VP16 (mit pEN_LBD41"B" von Willi Riber)		
p70SRUC	Stahl et al. 2004			
p35S:HF-ERF72 (CKC/ANT)	Angelika Mustroph			
p35S:HF-ERF74 (RAP2.12)	Angelika Mustroph			
p35S:HF-ERF75 (RAP2.2)	Angelika Mustroph			
p35S:GBD-GW	Ehlert et al. 2006	p35S:BD-RAP2.2 (aus pEN-ERF75, Wehner et al. 2011)		
pBGWL7	Karimi et al. 2005	pBGWL7_LBD41prom5'-2:LUC	60	61
		pBGWL7_3x33bpmin:LUC	131	132
p35S-rfA-HBD	Monika Tomar	p35S:(MA)RAP2.2-HBD	133	134
pMW#2	Deplancke et al. 2006	pMW#2_3x33bp:HIS	114	115
		pMW#2_3xARE:HIS	116	117
		pMW#2_3xATCTA:HIS	118	119
pMW#3	Deplancke et al. 2006	pMW#3_3x33bp:LacZ	114	115
		pMW#3_3xARE:LacZ	116	117
		pMW#3_3xATCTA:LacZ	118	119
pPromB0507.1-HIS	Reece-Hoyes et al. 2009			
pPromB0507.1-LAC	Reece-Hoyes et al. 2009			
pDEST-AD	Walhout et al. 2000	pAD-HRE1 (aus pEN-ERF73, Wehner et al. 2011)		
		pAD-HRE2 (aus pEN-ERF71, Wehner et al. 2011)		
		pAD-RAP2.2 (aus pEN-ERF75, Wehner et al. 2011)		
		pAD-RAP2.3 (aus pEN-ERF72, Wehner et al. 2011)		

		pAD-RAP2.12 (aus pEN-ERF74, Wehner et al. 2011)		
pAD:CES-1	Reece-Hoyes et al. 2009			
pDONR221	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)			

Tabelle A 5 Verwendete Oligonukleotide nach Funktion kategorisiert

	qualitative/semiquantitative PCR	
1	Tub_ATH_fw	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA
2	Tub_ATH_rev	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT
3	RT-EF-1a-N-fw	CAACCTTGACTGGTACAAGG
4	RT-EF-1a-N-rev	AGAACGCCTGTCAATCTTGG
5	NPTII_fw	TATGACTGGGCACAACAGACA
6	NPTII_rev	TTCAGCAATATCACGGGTAGC
7	LBD41_fw	GCAAGCTAACGCAACTGTCTT
8	LBD41_rev	ACGCCGATCCTTCTCTTCTTA
9	GFPriv_fw	CTGACCCTGAAGTTCATCTGC
10	GFPriv_rev	GGTGCTCAGGTAGTGGTTGTC
11	LBD41_Crub_fw	CGGAAAGGGTGTAGTGAGGAT
12	LBD41_Crub_rev	ACGTGCTCTCCTTCTGACAC
13	RAP22_fw	CCGCGTCACTAACGAGTTTAT
14	RAP22_rev	CTCCACTGGGTTTTCTCTTC
15	RAP212_fw	TCTTCGATTTTGACGCTGAGT
16	RAP212_rev	TTGGCTTCCTCAAAGAACAGA
17	270_fw	TCTACAAGCAAAGCATGGACA
18	270_rev	TTGAGCTGTTGGGGTCCTAAT

19	CBP1_fw	ACATAGCAATATTAGTGGCAGA
20	CBP1_rev	GAGGTTCAAACGTGACTTATAG
21	ADH_fw	ATGTCTACCACCGGACAGATT
22	ADH_rev	GGTGTTGATCCTGAGAAGAT
23	PDC1_fw	CTTAGGTGCTTCCAAACGGTG
24	PDC1_rev	CTTTCGCAGAAGGCATCATCG
25	SRO5_fw	ATCTCGTGCAAAGCTCAAGAC
26	SRO5_rev	TCAATACAGGAAATGCCATCC
27	RRTF1_fw	ACAGAACCGAATTTCGTCGG
28	RRTF1_rev	ATCTCCATTCCCAAATCCA
29	SAIL_LB3	GAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
30	oligodT	TTTTTTTTTTTTTTT
31	Rap23_fw3	AAACTCACGGCTGAGGAACTC
32	Rap23_rev3	CTCATACGACGCAATGACATC
33	Rap23_fw4	CGTAACTCGCAAAGATGAACC
34	Rap23_fw8	CACCATCCTCCTCCTCCTAAT
35	Rap23_fw8a	CTTCTACTCCTCCGCCATCG
36	Rap23_rev4	GAAAGGCTGCAAATTCTTCTG
37	Rap23_rev6	GGTGGCTGATCGGATAATCTT
38	Rap23_rev6a	AGGCTGATCGGTTGATCGTG
39	ACS8_fw	GTATTTTTGGGGTTGGGAAGA
40	ACS8_rev	TGGTTTAGTTTCGGTTCGTGTC
	qRT-PCR	
41	sgAt5g15120fw	TCCGACCATGCCGTATTTCC
42	sgAt5g15120rev	ACACCAGAAGGTGGCAAACA

43	sgAt3g10040Fw	AATGGCGAGAATTGCGGAGA
44	sgAt3g10040Rv	CCGTCGATATCCTCCGCTTC
45	sgAt5g39890Fw	TACTGTACCCGGCTGATGGA
46	sgAt5g39890Rv	AGTACAATGACGTCCTGCGG
47	sgPDC1fw	CCGCTGTGATTGCTGAAACC
48	sgPDC1rev	GCCAACACTCGCTTTTCTGG
49	LBD41_fwRT2	CGTGCTGGACTCATGAACCTCATC
50	LBD41_revRT2	GATCGGAAAATCCCAGGACGAAGG
51	ADH_fw_realtime	GTTCACTCTGGTCAGGTTGCTAAG
52	ADH_rev_realtime	TGCTCCTAACCCAGTAGACAAACC
53	LUC_sg_fw	ACCGGAAAACCTCGACGCAAG
54	LUC_sg_rev	GGACTTTCCGCCCTTCTTGG
55	sgAt3g10040Fw	AATGGCGAGAATTGCGGAGA
56	sgAt3g10040Rv	CCGTCGATATCCTCCGCTTC
57	EF1alpha_realtime_fw	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
58	EF1alpha_realtime_rev	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
	Klonierungen	
59	LBD_pro_fw	AAAAAGCAGGCTgtaaattgtaatcttgata
60	LBD_pro_fw_2	AAAAAGCAGGCTTTTAACCAAATCCTACTCCA
61	LBD_pro_rev	AGAAAGCTGGGTctttggttcgattatctt
62	PDC_pro_fw	AAAAAGCAGGCTgtagcagaaagctcatcat
63	PDC_pro_fw3	AAAAAGCAGGCTCTTGAAAGTTACGACGACAA
64	PDC_pro_rev	AGAAAGCTGGGTggaaatgggaaggttgagt
65	wound_pro_fw	AAAAAGCAGGCTaagtgatttggttcgatt
66	wound_pro_fw_2	AAAAAGCAGGCTTTCATCTCCAACATGCATTA

67	wound_pro_rev	AGAAAGCTGGGTctttcttcagagaattaaa
68	prLBD41_fw_BamHI	AAAAGGATCCGATATGAATTGCAGTAGAATC
69	LBDprC_BamHI_fw	TTTTGGATCCTTTAACC AAAATCCTACTCCA
70	prLBD41_rev_NcoI	TATTCCATGGCTTTGGTTTCGATTATCTTAC
71	C5T_fw	CCTTGAATCAGGGTGAAGAAAAATAGCGGCGGTTCT
72	C5T_rev	AGAACCGCCGCTATTTTTCTTCACCCTGATTCAAGG
73	A6T_fw	AATCAGGGTGAAGAAAAACTGCGGCGGTTCTGG
74	A6T_rev	CCAGAACCGCCGCAGTTTTCTTCACCCTGATT
75	G10T_fw	GGGTGAAGAAAAACAGCGTCGGTTCTGGGAAAATAAA
76	G10T_rev	TTTATTTTCCCAGAACCGACGCTGTTTTCTTCACCC
77	C11T_fw	GGTGAAGAAAAACAGCGGTGGTTCTGGGAAAATAAAG
78	C11T_rev	CTTTATTTTCCCAGAACCACCGCTGTTTTCTTCACC
79	T10-C11T_fw	TCAGGGTGAAGAAAAACAGCGTTGGTTCTGGGAAAAT
80	T10-C11T_rev	ATTTTCCCAGAACCAACGCTGTTTTCTTCACCCTGA
81	motif2_GzuT_fw	CCCCAAAAATCCAGGGTCTTCTTACACGCACAC
82	motif2_GzuT_rev	GTGTGCGTGTAAGAAGACCCTGGATTTTGGGG
83	LBDprF_fw_BamHI	TTTTGGATCCCGTTTTAGAACGAATTAGATTG
84	LBDprG3_fw_BamHI	TATTGGATCCTGAATCAGGGTGAAGAAAA
85	LBDprG4_fw_BamHI	TATTGGATCCGCGGTTCTGGGAAAATAAA
86	LBDprH_fw_BamHI	TATAGGATCCTAAAAGACAAAACAACCCTTGT
87	LBDprI_fw_BamHI	TTTTGGATCCATAATCTCTCTCCGCTTCCC
88	prLBD41_rev_NcoI	TATTCCATGGCTTTGGTTTCGATTATCTTAC
89	AT5G15120pr1_BamHI_fw	TTTTGGATCCAAAAGAATGGCCCCTGGTTT

90	AT5G15120pr2_BamHI_fw	TTTTGGATCCGTAATCGATAATGGTATAATCC
91	AT5G15120pr_NcoI_rev	AAAACCATGGAAAAGTCTCCCAAACCCAA
92	prPDC1_fw_BamHI	AAAAGGATCCGTAGCAGAAAGCTCATCATG
93	PDCprC_BamHI_fw	TTTTGGATCCCTTGAAAGTTACGACGACAA
94	PDCprF_fw_BamHI	TATTGGATCCTAGCAATTACACTTCTTCATT
95	PDCprG_fw_BamHI	TATTGGATCCTAACTCAAATTTGGAATGGG
96	PDCprH_fw_BamHI	TATTGGATCCTTAGTTCATAATTAAGAGGAG
97	PDCprI_fw_BamHI	AAAAGGATCCTTCCAATGGTAATAATCTGTT
98	PDCprJ_fw_BamHI	TATTGGATCCGGTCAAATCTCAAAGTTAGA
99	PDCprK_fw_BamHI	AAAAGGATCCAACAGAAACCAAAAACCACTA
100	PDCprL_fw_BamHI	TATTGGATCCTGTATTCTCCTAGTCTCTA
101	prPDC1_rev_NcoI	TATACCATGGGGAAATGGGAAGGTTTGAGT
102	HADpr1_fw_BamHI	TATTGGATCCAGCTCCTTTGTCTCTGTTGT
103	HADpr1_rev_NcoI	TAATCCATGGCAAATCCTTTCACCAAAATC
104	At5g20790pr_fw_BamHI	TATTGGATCCAGAATCGACATTTGAACTCC
105	At5g20790pr_rev_NcoI	TAATCCATGGCGATCTCTTTATTGAAGTGTGT
106	MGD3pr_fw_EcoRI	TATTGAATTCTTGTAATTATGTTTATCGCACA
107	MGD3pr_rev_NcoI	TAATCCATGGCATGACTATTTGGTGTTGAAG
108	d35S_fw_BamHI	TATTGGATCCCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
109	d35S_rev_NcoI	TTATCCATGGTCCTCTCCAAATGAAATGAA
110	LBDprK_rev_BamHI	TTTTGGATCCGGATTGTGTGCGTGTAAGAA
111	LBDprM_rev_BamHI	TATAGGATCCAGAGCTGTTTTCTCTAAAG
112	LBDprN_rev_BamHI	TATAGGATCCTCTCTAAAGACAAGGGTTG
113	LBDprL_rev_BamHI	TTTTGGATCCTTTATTTTCCAGAACCGC

114	3xLBDprL_BamHI_plus	TATTGGATCCTGAATCAGGGTGAAGAAAAACAGCGGCGGTTCTTGAATCAGGGTGAAGAAAAACAGCGGCGGTTCTTGAATCAGGGTGAAGAAAAACAGCGGCGGTTCTGGATCCTATT
115	3xLBDprL_BamHI_minus	AATAGGATCCAGAACCGCCGCTGTTTTCTTCACCCTGATTCAAGAACCGCCGCTGTTTTCTTCACCCTGATTCAAGAACCGCCGCTGTTTTCTTCACCCTGATTCAGGATCCAATA
116	3x33bp_mut1_plus	TATTGGATCCTGAGCTCATACTGAGAAAAACAGCGGCGGTTCTTGAGCTCATACTGAGAAAAACAGCGGCGGTTCTTGA GCTCATACTGA
117	3x33bp_mut1_minus	AATAGGATCCAGAACCGCCGCTGTTTTCTCAGTATGAGCTCAAGAACCGCCGCTGTTTTCTCAGTATGAGCTCAAGAACCGCCGCTGT
118	3x33bp_mut2_plus	TATTGGATCCTGAATCAGGGTGAAGAAGCGACTATATGGTTCTTGAATCAGGGTGAAGAAGCGACTATATGGTTCTTGAA TCAGGGTGAA
119	3x33bp_mut2_minus	AATAGGATCCAGAACCATATAGTCGCTTCTTCACCCTGATTCAAGAACCATATAGTCGCTTCTTCACCCTGATTCAAGAAC CATATAGTC
120	3xARE-plus	TATTGGATCCAGAGAACAAGGCAAAACCAAATACGCCCCTAGAGAGAACAAGGCAAAACCAAATACGCCCCTAGAGAGA ACAAG
121	3xARE-minus	ATAAGGATCCCTAGGGGCGTATTTGGTTTTGCCTTGTTCTCTCTAGGGGCGTATTTGGTTTTGCCTTGTTCTCTCTAGGG GCGT
122	3xATCTA-plus	GATCCCAATCTAAATATCTAAAATATAAACAATCTAAATATCTAAAATATAAACAATCTAAATATCTAAAATATAAAG
123	3xATCTA-minus	GATCCTTTATATTTTAGATATTTAGATTGTTTATATTTTAGATATTTAGATTGTTTATATTTTAGATATTTAGATTGG
124	ZFP1_GW_fw	AAAAAGCAGGCTCAATGGAACCGTCCATCAAAG
125	ZFP1_GW_rev	AGAAAGCTGGGTTTCATAGCTTAAGAGTCAAGTC
126	ZFP1_dEAR_GW_rev	TTAATTTTCTTAAACTGATTATGATC
127	Rap23_GW_fw	AAAAAGCAGGCTTCATGTGTGGCGGTGCTATTAT
128	Rap23_GW_rev	AGAAAGCTGGGTTTACTCATACGACGCAATGAC
129	VP16_pHBTL_fw	TATTAATTAACGCCCCCCCCGACCGATGTCAG
130	VP16_pHBTL_rev	TGTTAATTAACCCACCGTACTCGTCAATTCC

131	3xLBDpr3_fw_GW	AAAAAGCAGGCTCAAGCTTGGATCCTGAATCA
132	35Smin_rev_GW	AGAAAGCTGGGTTCCTCTCCAAATGAAATGAA
133	RAP22_fw_GW_CtoA	AAAAAGCAGGCTTAATGGCAGGAGGAGCTATAATCTC
134	Rap22_GW_Cterm_rev	AGAAAGCTGGGTAAAGTCTCCTTCCAGCATGAA
135	attB1_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
136	attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Tabelle A 6 Position, Orientierung und Sequenz von C9-Motiven in Promotoren von 49 core Hypoxiemarkergenen D repräsentiert den direkten und R den reversen Strang. Ein *sig-value* von mindestens 4,5 wurde als Mindestniveau zur Übereinstimmung mit der C9-Motiv-Konsensussequenz gewählt. Höhere *sig-values* repräsentieren stärkere Übereinstimmung

Name	Strang	Start	Ende	Sequenz	sig-value
ACHT5	D	-978	-967	GCCCATCGTTTC	4.626
ADH1	D	-207	-196	GCCCCTAGTATT	4.797
AT1G33055	D	-119	-108	GCCCCTAGTTTT	6.008
AT1G74940	D	-1133	-1122	GCCCATTTGTTTT	4.886
AT2G17850	R	-130	-119	GCCGTTGGATTT	4.797
AT2G17850	R	-277	-266	GCCGATTGTTTT	4.553
HRA1	R	-311	-300	GCCCATGGTTTT	6.444
HRA1	D	-370	-359	GCCCCTTGGTTT	5.349
HRA1	R	-418	-407	GCCACTGTTTTT	4.979
AT3G27220	R	-129	-118	GCCGGTGGTTTT	5.907
AT3G27220	R	-159	-148	GCCGGTGGTTTC	5.622
AT4G10270	R	-302	-291	GCACCTGGTTTT	6.336
AT4G10270	D	-1161	-1150	GCTGCTGGTTTT	5.701
AT4G10270	R	-172	-161	GCCGTTGGTTTT	5.701
AT4G17670	D	-2055	-2044	GCCACAGGATTT	5.072
AT4G24110	R	-828	-817	GCTGCTGGTTTT	5.701
AT4G27450	D	-2910	-2899	GCCACTGATTTT	4.886
AT4G33070	R	-685	-674	GCAGATGGTTTT	4.714
AT4G33560	R	-176	-165	GCTCGTGGTTTT	4.886
AT4G33560	D	-139	-128	GCCTCTTGTTTC	4.797
AT4G39675	D	-307	-296	GCCGCTGGTATA	4.979

<i>PCO1</i>	D	-164	-153	GCCCCTGGTTTT	7.885
<i>AT5G26200</i>	R	-376	-365	GCCACTTGTTTC	4.979
<i>PCO2</i>	D	-213	-202	GCCCCTGGTTTT	7.718
<i>AT5G47060</i>	D	-145	-134	GCCCCTTGTTTT	6.106
<i>AT5G66985</i>	D	-238	-227	GCCACCAGTTTT	4.797
<i>CML38</i>	D	-312	-301	GCCGGTGGTCTC	4.626
<i>ETR2</i>	R	-526	-515	GCCGTTGGTTTT	5.701
<i>FHL</i>	D	-209	-198	GCCAACGGTTTC	4.979
<i>HB1</i>	D	-183	-172	GCACATGGTTTC	4.886
<i>LBD41</i>	R	-194	-183	GCCCCTGGATTT	6.871
<i>LBD41</i>	R	-748	-737	GCTCCTGGTTTT	6.249
<i>LBD41</i>	R	-349	-338	GCCGCTGTTTTT	5.427
<i>NIP2;1</i>	R	-296	-285	GCAGATGGTTTT	4.714
<i>PFK6</i>	R	-209	-198	GCGGCTGGTTTT	5.701

Tabelle A 7 Alle verwendeten transgenen Linien

Bezeichnung	Laborbezeichnung	Linie	Generation	Genotyp
LBD41-prom5'-1:GFP	LBDpr1_GFP:RPL18	4	T3	ungetestet
		8	T2	heterozygot
		10	T2	heterozygot
LBD41-prom5'-2:GFP	LBDpr4_GFP:RPL18	12	T3	homozygot
		15	T3	homozygot
		33	T3	homozygot
PDC1-prom5'-1:GFP	PDCpr1_GFP:RPL18	3	T2	heterozygot
		4	T2	heterozygot
PDC1-prom5'-4:GFP	PDCpr4_GFP:RPL18	7	T3	homozygot
		5	T3	homozygot
		9	T3	homozygot
At4g10270-prom5'-1:GFP	Woundpr1:GFP:RPL18	3	T2	heterozygot
		9	T2	heterozygot
At4g10270-prom5'-2:GFP	Woundpr4:GFP:RPL18	2	T3	heterozygot
		4	T3	heterozygot
		5	T3	heterozygot

LBD41-prom5'-2:LUC	pBGWL7_LBDpr4	8	T3	homozygot
		5 (in Abb. 2 gezeigt)	T3	homozygot
		4	T3	homozygot
		7	T3	homozygot
RAP2.2 OE	ERF5	1 (entspricht 6)	T3	homozygot
		2 (entspricht 18)	T3	homozygot
RAP2.3 OE	ERF2	1 (entspricht 4)	T3	homozygot
		2 (entspricht 5)	T3	homozygot
		3 (entspricht 24)	T3	homozygot
RAP2.12 OE		1 (entspricht 3)	T3	homozygot
		2 (entspricht 30)	T3	homozygot
33bp:LUC	33bpLUC	a (entspricht 2)	T3	homozygot
		b (entspricht 31b)	T3	homozygot

Danksagung

Ich danke Angelika Mustroph recht herzlich, dass sie mir das Vertrauen und die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Doktorarbeit gegeben hat. Danke für die großartige Betreuung und die immer offene Bürotür.

Danke an Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser und seinen Mitarbeitern Nora Wehner, Christoph Weiste und Jasmin Göttler für die Ermöglichung des PTA-Screenings in ihrem Labor in Würzburg.

Ich danke dem gesamten Lehrstuhl Pflanzenphysiologie Bayreuth, insbesondere Natalia Hess, Willi Riber und Michael Weber für entscheidende Diskussionen und Hilfestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Pia Schuster, Marlen Ortel, Vanessa Troßmann, Fabian Zech, Judith Bäuml, Moritz Funding und Jana Müller, deren hervorragenden Daten in diese Arbeit eingeflossen sind.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Studentin Jana Müller für die unproblematische Zusammenarbeit in einer stressigen Lebensphase sowie für die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Meiner lieben Frau Anna-Clara danke ich für die, mir sehr wichtige, Bereicherung meiner Freizeit und für die aufopferungsvolle Betreuung unseres Sohnes während der Anfertigung dieser Dissertation.

Ich danke meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und Motivation.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....

Ort, Datum, Unterschrift